

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ХИМИКО-
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



ЛЁЗИНА АЛЁНА ВЛАДИМИРОВНА
**ФИТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ СЫРЬЯ
РОДИОЛЫ ЧЕТЫРЕХЛЕПЕСТНОЙ И ОРТИЛИИ ОДНОБОКОЙ**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель
доктор фармацевтических наук, доцент
Тернинко Инна Ивановна

Санкт-Петербург – 2022 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ФИТОТЕРАПИЯ: АКТУАЛЬНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ. ХАРАКТЕРИСТИКА И СТЕПЕНЬ ИЗУЧЕННОСТИ ОБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ - ORTHILIA SECUNDA И RHODIOLA QUADRIFIDA (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	14
1.1. Актуальность применения растительных препаратов в современной терапевтической концепции.	14
1.2. Фитотерапия в лечении и профилактике гинекологических патологий.....	16
1.3. Фармакогностическая характеристика и степень изученности объектов исследования	20
1.3.1. Ботаническая характеристика <i>Orthilia secunda</i> L.	20
1.3.2. Ареал произрастания и заготовка ортилии однобокой	21
1.3.3. Химический состав травы ортилии однобокой.....	22
1.3.4. Фармакологические эффекты и применение травы ортилии однобокой..	22
1.3.5. Ботаническая характеристика <i>Rhodiola quadrifida</i> (Pall.) Fisch. & C.A. Mey. 23	
1.3.6. Ареал произрастания и заготовка родиолы четырехлепестной	24
1.3.7. Химический состав растений рода Родиола.....	25
1.3.8. Фармакологические эффекты и применение растений рода родиола.....	27
Выводы к главе 1.....	29
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	30
2.1. Материалы исследования	30
2.2. Методы исследования.....	32
2.2.1. Методы определения подлинности и доброкачественности ЛРС.....	32
2.2.1.1. Определение макро- и микроскопических признаков сырья (подлинность)	32
2.2.1.2. Определение числовых показателей (доброкачественность) и технологических параметров сырья.....	33
2.2.2 Методы фитохимического анализа объектов исследования	33
2.2.2.1. Методика приготовления извлечений	33
2.2.2.2. Предварительный фитохимический скрининг групп БАВ с помощью качественных реакций	34
2.2.2.3. Хроматографический скрининг маркерных групп БАВ.....	35
2.2.2.4. Методы количественного определения БАВ	36
Е. Количественное определение ГКК в сырье родиолы разнозубчатой методом УФ-спектрофотометрии [92]	44
F. Определение минерального состава изучаемых видов сырья.....	45
2.2.3. Выделение и установление структуры индивидуальных соединений корневищ с корнями родиолы четырехлепестной	46
2.2.3.1. Получение отдельных фракций.....	46
2.2.3.2 Выделение индивидуальных соединений	47
2.2.3.3 Установление структуры полученных соединений.....	48
2.2.3.4 Прогностическая оценка фармакологической активности выделенных соединений	48
2.2.3.5 Изучение ГФ методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией	49
2.2.4. Методы статистической обработки результатов	49

ГЛАВА 3. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЯ ORTHILIA SECUNDA L. И РАСТЕНИЙ РОДА RHODIOLA.....	50
3.1. Результаты фитохимического скрининга основных групп БАВ.....	50
3.1.1. Результаты предварительного фитохимического исследования с помощью групповых качественных реакций.....	50
3.1.2. Хроматографическое исследование основных групп БАВ	50
3.1.3. Компонентный состав гексановой фракции корневищ и корней родиолы четырехлепестной.....	64
3.1.4. Количественное определение основных групп БАВ.....	66
3.1.4.1. Количественное определение родоспецифичных фенольных соединений и их гликозидов в 3 видах растений рода <i>Rhodiola</i>	66
3.1.4.2. Количественное определение арбутина в траве ортилии однобокой.....	70
3.1.4.3. Количественное определение полифенольных соединений и галловой кислоты в траве ортилии однобокой методом УФ-спектрофотометрии.....	73
3.1.4.4. Количественное определение суммы ГКК в пересчете на хлорогеновую кислоту методом УФ-спектрофотометрии	74
3.1.5. Изучение минерального состава исследуемых видов сырья	75
Выводы к главе 3	82
ГЛАВА 4. ВЫДЕЛЕНИЕ И УСТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ СЫРЬЯ РОДИОЛЫ ЧЕТЫРЕХЛЕПЕСТНОЙ И ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ.	84
4.1 Выделение индивидуальных соединений	84
4.2. Установление структуры соединений	85
4.3. In silico прогноз фармакологической активности выделенных индивидуальных соединений	92
Выводы к главе 4.....	95
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ СЫРЬЯ ОБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	96
5.1. Стандартизация травы ортилии однобокой	96
5.1.1. Морфолого-анатомический анализ травы ортилии однобокой.....	96
5.1.2. Определение технологических параметров травы ортилии однобокой...102	
5.1.3. Разработка проекта фармакопейной статьи на траву ортилии однобокой 103	
5.2. Стандартизация корневищ с корнями родиолы четырехлепестной	103
5.2.1. Морфолого-анатомический анализ корневищ с корнями родиолы четырехлепестной.....	103
5.2.2. Установление фармакопейных числовых показателей корневищ и корней родиолы четырехлепестной.....	107
5.2.3. Определение технологических параметров сырья родиолы четырехлепестной.....	109
5.2.4. Разработка проекта ФС на корневища и корни родиолы четырехлепестной.....	110
Выводы к главе 5.....	111
ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ФИТОСУБСТАНЦИИ НА ОСНОВЕ СЫРЬЯ ОРТИЛИИ И РОДИОЛЫ ЧЕТЫРЕХЛЕПЕСТНОЙ	112
6.1. Подбор оптимального соотношения сырья объектов исследования в растительном сборе	112
6.1.1. ВЭТСХ исследование целевых компонентов фитокомпозиций	113
6.1.2. Результаты количественного определения целевых компонентов сборов и валидация аналитических методик	114

6.2. Стандартизация растительного сбора из сырья родиолы четырёхлепестной и ортилии однобокой	126
6.2.2. Технологические параметры сбора.....	129
6.2.3. Макро- и микроскопический анализ растительной композиции.....	129
6.2.4. Разработка проекта НД на сбор	130
Выводы к главе 6.....	131
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	132
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	136
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	138
ПРИЛОЖЕНИЕ А	154
ПРИЛОЖЕНИЕ В	156
ПРИЛОЖЕНИЕ Г	157
ПРИЛОЖЕНИЕ Д	158
ПРИЛОЖЕНИЕ Е	165
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж	172

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Фармация является одной из наиболее социально значимых и ориентированных отраслей промышленности, что обусловлено тенденцией к монотонному росту и хронизации различных патологических состояний и, как следствие, необходимостью поиска новых препаратов направленного действия [1]. По данным А.А. Лина [2], инвестиционные объемы в фармацевтическую индустрию и науку составляют 150 млрд. долларов в год (по данным 2015 года).

Научный поиск потенциальных лекарственных кандидатов характеризуется многовекторностью и охватывает классы соединений различного происхождения: синтетические, природные, биотехнологические и др. Лекарственное растительное сырье (ЛРС) имеет давнюю историю применения и, являясь элементом этнофармакологии, остается в фокусе научных групп как одно из целевых направлений для поиска новых биологически активных веществ (БАВ), кроме того фитопрепараты характеризуются лучшей биодоступностью [3], возможностью применения в различных возрастных группах [4], а также плеiotропным действием БАВ и способностью к потенцированию [5]. Это обуславливает рост потребления лекарственных продуктов растительного происхождения, который в 2011 году составил более 20 млрд долларов [6].

Однако отсутствие четких параметров стандартизации по конкретному соединению и экспериментальных данных, достаточных для целей доказательной медицины, ограничивают введение большинства лекарственных растений (ЛР) в официальную практику и оставляет их в плоскости биологически активных добавок (БАД), стандартизация которых существенно отличается от общепринятых подходов в фармацевтическом контроле качества.

Так, БАД на основе ЛРС родиолы четырехлепестной (*Sedum quadrifidum* Pall. – syn. *Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. & C.A. Mey. (красная щетка)) и

ортилии однобокой (*Orthilia secunda* L. (матка боровая)) пользуются спросом у населения. Данные растения позиционируются фитотерапевтами и народной медициной как средства для лечения заболеваний женской репродуктивной системы [7]. Данные о комплексном фитохимическом составе этих растений в научной литературе ограничены. Отдельные авторы (Ботоева Е.А. [8]) отмечают, что ортилия однобокая содержит флавоноиды, иридоиды, дубильные вещества, витамины. Наличие салидрозида в родиоле четырехлепестной было показано в работе К. Хохловой и О. Здрок [9]. Японскими учеными [10] установлено в корневищах родиолы четырехлепестной наличие флавоноидов и цианогликозидов. Однако отсутствие системной фитохимической оценки ортилии однобокой и родиолы четырехлепестной с установлением маркерных групп БАВ / отдельных соединений и критериев стандартизации ЛРС данных растений ограничивает их медицинское применение. Это создает предпосылки для комплексного фитохимического исследования ЛРС *Orthilia secunda* L. и *Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. & C.A. Mey., с последующим установлением критериев их стандартизации и обуславливает тему исследования как актуальную.

Степень разработанности темы исследования. Фармакогностическая характеристика травы ортилии однобокой отражена в работе Ломбоевой С.С. [11]. Отдельные разрозненные данные о фитохимическом составе представлены в работах Ботоевой Е.А. Однако вопросы количественной оценки отдельных маркерных соединений в т. ч. в сравнительном аспекте по зонам заготовки, маркерных групп БАВ в научной литературе не освещены. Информация в научной литературе о фитохимическом составе ЛРС родиолы четырехлепестной не носит системного характера и немногочисленна [12]. Значительная часть исследований в ряду растений рода *Rhodiola spp.* посвящена официальному фармакопейному виду родиоле розовой [13-20].

Цель и задачи исследования. Целью работы является комплексное фитохимическое профилирование ЛРС ортилии однобокой и родиолы

четырёхлепестной с выделением маркерных соединений и последующей стандартизацией, а также разработка растительной композиции на их основе.

Для достижения поставленной цели необходимо было решение следующих задач:

1. Исследовать фитохимический состав ЛРС ортилии однобокой и родиолы четырёхлепестной и установить маркерные группы БАВ;
2. Провести количественную оценку родоспецифичных фенольных соединений, определяющих фитохимический профиль растений рода *Rhodiola* для 3 видов в сравнительном аспекте;
3. Изучить макро- и микроэлементный профиль растений - объектов исследования и сформировать вывод об их избирательном накоплении;
4. Выделить индивидуальные соединения из корневищ с корнями родиолы четырёхлепестной, установить их структуру и провести прогностическую оценку биологического действия с помощью программы PASS;
5. Предложить критерии стандартизации травы ортилии однобокой и корневищ с корнями родиолы четырёхлепестной, разработать проекты ФС;
6. Разработать оптимальный состав растительного сбора из сырья ортилии однобокой и родиолы четырёхлепестной, выбрать критерии его стандартизации и провести валидационную и верификационную оценку использованных аналитических методик.

Научная новизна исследования. Впервые проведено комплексное фитохимическое исследование и стандартизация лекарственного растительного сырья родиолы четырёхлепестной и установлены маркерные группы БАВ сырья ортилии однобокой, что способствует расширению ассортимента растений – потенциальных лекарственных кандидатов.

В траве ортилии однобокой установлено наличие и определено количественное содержание 12 макро- и микроэлементов, идентифицировано 4 органические кислоты и 11 БАВ фенольной природы: 3 гидроксикоричных кислоты (ГКК), 5 флавоноидов, 3 фенолкарбоновых кислоты (ФКК). Впервые

в сырье ортилии установлено количественное содержание арбутина в сравнительном аспекте в зависимости от региона произрастания.

Впервые проведена оценка минерального состава родиолы четырехлепестной в сравнительном аспекте с официальным видом – родиолой розовой - в результате которого удалось количественно установить наличие 12 макро- и микроэлементов. Обнаружено 2 аминокислоты, 1 органическая кислота, 9 соединений фенольной природы, 2 из которых относятся к родоспецифичным фенольным соединениям растений рода *Rhodiola*, 3 ГКК, 3 флавоноида и 1 фенолкарбоновая кислота (ФКК). Впервые из ЛРС родиолы четырехлепестной выделено и идентифицировано 7 индивидуальных соединений - тирозол, кофейная кислота, этилгаллат, эпикатехин, катехин, п-гидроксibenзойная кислота, 3,4-дигидроксibenзойная кислота - которые накапливаются в мажоритарном количестве и составляют ее фитохимический профиль.

Впервые доказано, что для родиолы четырехлепестной не характерно наличие специфических для фармакопейного вида производных коричневого спирта.

Теоретическая и практическая значимость работы. Предложена методика последовательного фракционирования и выделения индивидуальных соединений из корней и корневищ родиолы четырехлепестной методами колоночной и препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для выделенных соединений методом прогностической оценки с помощью программы PASS приведены направления фармакологической активности с наибольшей вероятностью, что создает предпосылки для направленной разработки и проведения доклинического изучения лекарственных препаратов на их основе с целевым действием.

Применена фармакопейная методика количественного определения родоспецифичных фенольных соединений для сырья родиолы

четырёхлепестной методом ВЭЖХ, проведена ее верификация и установлены критерии пригодности хроматографической системы.

Применительно к сырью ортилии и растительной композиции на ее основе успешно использована методика КО галловой кислоты методом УФ-спектрофотометрии с расчетом по методу Фирордта. Проведена валидационная оценка данной методики, доказана ее воспроизводимость.

Предложен оптимальный состав сбора на основе сырья родиолы и ортилии, разработаны критерии его стандартизации.

Разработанные критерии стандартизации легли в основу 2 проектов фармакопейных статей (ФС) «Родиолы четырехлепестной корневища и корни» и «Ортилии однобокой трава», а также проекта нормативной документации (НД) «Сбор гинекологический №1».

Установлены технологические параметры и числовые фармакогностические характеристики ЛРС ортилии однобокой и родиолы четырехлепестной, а также растительной композиции на их основе, которые могут быть использованы при разработке растительных лекарственных препаратов и приведены в проектах ФС.

Проекты ФС апробированы в производственной деятельности в (лаборатория ОКК) ООО «Фитолеум» (Республика Казахстан) (акт внедрения б/н от 6 июня 2022 г) (Приложение А), СПб ГБУЗ «СЗЦККЛС» (акт внедрения б/н от 8 июня 2022 г) (ПРИЛОЖЕНИЕ Б), в научный (акт внедрения б/н от 15 июня 2022 г) и учебный (акт внедрения б/н от 18 июня 2022 г) процесс кафедры фармакогнозии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (ПРИЛОЖЕНИЯ В,Г).

Методология и методы исследования. В работе применялись методологические подходы эксперимента, применяемого в фармакогнозии, направленного на стандартизацию ЛРС. Фитохимический анализ был проведен с применением таких классических и современных физических и физико-химических методов анализа, как хроматографические (тонкослойная, высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ), колоночная

хроматография, ВЭЖХ, газовая хроматография с масс-спектрометрией), спектральные (спектрофотометрия в УФ- и видимой областях спектра, атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (АЭС), спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) , масс-спектрометрия). Для определения ботанических диагностических признаков ЛРС были использованы морфолого-анатомические и органолептические методы. Для установления фармакопейных числовых показателей и технологических параметров были задействованы технологические и товароведческие методы. Фармакологическую активность БАВ устанавливали с помощью программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances). Статистическую обработку полученных результатов проводили методами математической статистики в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [92].

Основные положения, выносимые на защиту:

На защиту выносятся следующие положения и результаты, которые определяют научную новизну и практическую значимость работы:

1. Результаты комплексного фитохимического исследования травы ортилии однобокой и корневищ с корнями родиолы четырехлепестной с установлением маркерных БАВ;
2. Профиль родоспецифичных фенольных соединений растений 3 видов рода *Rhodiola* в сравнительном аспекте;
3. Результаты выделения и изучения структуры индивидуальных соединений сырья родиолы четырехлепестной и *in silico* прогноз их фармакологической активности;
4. Результаты адаптации и валидационной оценки методики количественного определения галловой кислоты в сборе гинекологическом;
5. Критерии стандартизации травы ортилии однобокой, корневищ с корнями родиолы четырехлепестной и растительной композиции «Сбор гинекологический №1» на их основе.

Степень достоверности и апробация результатов. Основные результаты исследований докладывались и обсуждались на научных российских и международных конференциях различного уровня: X, XI, XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, 2020, 2021, 2022); VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации» (Санкт-Петербург, 2019); международной научной конференции «Современные достижения фармацевтической науки и практики» (г. Витебск, 2019); международной научно-практической конференции «Современные достижения фармацевтической науки в создании и стандартизации лекарственных средств и диетических добавок, содержащих компоненты природного происхождения» (г. Харьков, 2021); международной научной конференции «90 лет – от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы» (г. Москва, 2021); международной научно-практической конференции «Разработка лекарственных средств-традиции и перспективы» (г. Томск, 2021).

Публикации материалов исследования. По теме диссертационной работы было опубликовано 12 печатных работ. Из которых 2 статьи в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 1 статья в издании, индексируемом в наукометрической базе данных Scopus, и 9 тезисов.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом исследовательских работ ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России в рамках тематики государственного задания «Разработка методологической концепции контроля качества лекарственных средств и субстанций природного происхождения с использованием инновационных аналитических методов» (регистрационный номер АААА-А20- 120121790032-2 от

17.12.2020) и инициативной темы «Инновационные подходы в стандартизации лекарственных средств синтетического и природного происхождения» (номер гос. регистрации: АААА-А19-119030590044-6, зарегистрирована 05.03.2019).

Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов. Лёзиной А.В. совместно с научным руководителем д.фарм.н., доц. И.И. Тернинко были определены основные векторы исследовательской работы, сформулирована цель и спланированы задачи для её достижения. Литературный поиск, анализ и систематизацию данных научных публикаций Лёзина А.В. осуществляла самостоятельно. Автором лично был произведен весь объем экспериментальных работ, осуществлена интерпретация и статистическая обработка полученных результатов, их оформление в виде научных публикаций.

Экспериментальные исследования (АЭС-ИСП, ВЭЖХ, ГХ-МС, колоночная хроматография, препаративная ВЭЖХ) проводили с использованием парка оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России». ЯМР анализ проводили на базе парка научно-технического оборудования СПбГУ им. Петра Великого. Исследование морфолого-анатомических характеристик травы ортилии однобокой и корневищ и корней родиолы четырехлепестной проводились с помощью комплекса оборудования Ботанического института им. В.Л. Комарова Российской академии наук (БИН РАН). Личный вклад автора составил не менее 90%.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия», а именно: пункт 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; и пункт 7 – Изучение биофармацевтических аспектов стандартизации

и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе; изучение влияния экологических факторов на химические и биологические свойства лекарственных растений; оценка экотоксикантов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных средствах.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 188 страницах компьютерного набора, иллюстрирована 46 рисунками и 44 таблицами. Структура работы состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», 4 экспериментальных глав, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и 6 приложений. Библиография включает 135 ссылок на литературные источники, в том числе 80 ссылок на иностранных языках.

ГЛАВА 1. ФИТОТЕРАПИЯ: АКТУАЛЬНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ.
ХАРАКТЕРИСТИКА И СТЕПЕНЬ ИЗУЧЕННОСТИ ОБЪЕКТОВ
ИССЛЕДОВАНИЯ - *ORTHILIA SECUNDA* И *RHODIOLA QUADRIFIDA*
(ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Актуальность применения растительных препаратов в современной терапевтической концепции.

Фитотерапия (ФТ) относится к традиционным методам лечения, исторические аспекты применения которой заложены традиционной этнофармакологией и сформированы эмпирически опытом поколений [21-24]. Развитие химической науки и промышленности сдвинул вектор поиска новых фармакологически активных соединений в сторону химического синтеза и биотехнологической индустрии. Однако фитопрепараты, по-прежнему, остаются востребованными в терапии и профилактике различных нозологий [25-27], что обусловлено рядом позитивных потребительских факторов этой группы лекарственных средств. В работе Ньюмана и Крэгга [28] приведены данные по источникам получения новых лекарственных веществ с 1981 по 2019 годы. Авторы показывают, что в этот период было одобрено 1881 новых препарата и указывают категории их получения. Таким образом, по данным исследователей, 23,5% приходится на источники природного происхождения. Из них 3% это растительные продукты, которые применяются при аллергическом рините, анемии, артрите, раковых заболеваниях, псориазе, доброкачественной гиперплазии предстательной железы.

За последние 30 лет в мире наблюдается монотонная тенденция к росту применения фитопрепаратов [29]. В США в 1990-х доля ФП в структуре покупок посетителей аптек составляла 12% и до начала 2000 годов она выросла на 41% [30]. По данным NEXT Trend [31] в 2020 году прием БАД для 33% жителей США стал актуальнее, чем годом ранее, что говорит о высокой популярности данных продуктов. Также авторы указывают, что около 20% потребителей ожидают рост спроса на добавки к пище. В Европе в период с

1990 по 2010 также возрос интерес к альтернативным методам лечения (применяли 30-50% населения), в том числе к фитотерапии [32].

В 2013 году ВОЗ рекомендовала государствам ввести нетрадиционные методы лечения в политику здравоохранения [33] в связи с их популярностью среди населения, а также с потенциалом для раскрытия возможностей официальной медицины.

В России по данным на 2017 год доля фитопрепаратов на рынке составляет около 20% от всех зарегистрированных ЛП [34], что значительно превышает данный показатель по сравнению с другими странами Европы (в Германии доля фитопрепаратов составляет 6,86%, Словении – 1,31%, Франции – 1,22%). По прогнозам технического отдела исследований британской радиовещательной корпорации [35] рынок фитопрепаратов будет увеличиваться на 6,6% каждый год, что свидетельствует об актуальности данной категории ЛП.

В настоящее время ФТ применяется и в форме биологически активных добавок (БАД). Большое разнообразие БАД на растительной основе на фармацевтическом рынке связано с высоким спросом населения на данную группу продуктов [36-38]. По данным DSM GROUP в Российской Федерации количество БАД в аптечном сегменте выросло с 2009 года почти в 2 раза [39]. Ежегодно каждый россиянин приобретает 2 упаковки БАД [40]. Лидирующие места по объему продаж на российском рынке занимают такие производители, как «Solgar» (США) и «ЭВАЛАР» (Россия) [39]. Данные компании позиционируют свою продукцию как «натуральную», то есть полученную из природных источников [41, 42]. В годовом отчете DSM GROUP за 2021 год также отражена динамика продаж БАД по назначению [39]. Таким образом, за отчетный период лидерами продаж в денежном эквиваленте стали БАД, применяемые при вирусных и грибковых заболеваниях (33%); добавки, применяемые для устранения различных проблем с кожей и волосами (19%); применяемые при заболеваниях костной системы (19%). Средний прирост показали группы добавок, действующие на сердечно-сосудистую (8%),

мочевыделительную (8%), иммунную (5%) и репродуктивную (4%) системы. Отрицательный прирост в денежном эквиваленте за 2021 год показали группы БАД для профилактики онкологических заболеваний (-20%), для похудения и очищения организма (-17%), применяемые при отравлениях и интоксикации (-4%), влияющие на функцию желез внутренней секреции (-3%).

1.2. Фитотерапия в лечении и профилактике гинекологических патологий

Патологии женской репродуктивной системы являются одними из наиболее часто возникающих заболеваний в жизни женщин, существенно ухудшающих качество жизни и, в ряде случаев, приводящих к инвалидизации трудоспособного населения, что негативно сказывается как на демографии, так и на экономико-социальной ситуации в целом. Онкологические заболевания, такие как рак молочных желез и шейки матки, занимают лидирующее место (33% и 13% соответственно) среди опухолевых заболеваний у женщин [43-48]. Также одними из распространенных гинекологических заболеваний являются эндометриоз (ЭМ) (10–15% женщин репродуктивного возраста по всему миру) [49-53] и воспалительные заболевания органов малого таза (ВЗОМТ) [54-58]. Для лечения указанных патологий в официальной медицине существует несколько подходов к лечению. В зависимости от симптомов, патогенеза, особенностей организма могут быть использованы такие методы как хирургическое вмешательство, лучевая и лекарственная терапия [59, 60]. Стоит отметить, что лечение зачастую провоцирует серьезные побочные эффекты (ПЭ), например сердечно-сосудистые, почечные, костные, иммуноопосредованные осложнения [61-64].

Высокая частота развития нежелательных реакций (НР) при лечении заболеваний женской половой системы мотивируют пациенток искать альтернативные и/или дополнительные подходы, одним из которых является ФТ [65-73], которая используется как самостоятельно, так и в комплексе с традиционными способами лечения.

Заболевания женской репродуктивной сферы являются группой патологий, в которой фитотерапия в комбинации с оперативным вмешательством и медикаментозным лечением занимает значительное место и является средством профилактики. В ГРЛС зарегистрировано 7 лекарственных растительных препаратов (таблица 1) (ЛРП): «Циклодинон», «Мастодинон», «Климадинон» и «Климадинон УНО» (AG Бионорика, Германия), «Ци-клим» (ООО «Эвалар», Россия), «Клиофит» (ФП «Милиген», Россия), «Лахезис комп» (ООО «ВАЛА-Р», Россия) которые применяются в терапии гинекологических патологий [74].

Таблица 1 – Характеристика ЛРП на российском рынке

№	Наименование	Состав растений	ЛФ, форма выпуска
1	2	3	4
1	«Циклодинон»	Прутняк обыкновенный	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой, в упаковках по 30 или 60 штук. Капли для приема внутрь, во флаконах по 50 или 100 мл.
2	«Мастодинон»	Витекс священный, Голубой кохош, Цикламен европейский, Стрихнос игнации, Ирис разноцветный, Лилия ланцетолистная	Таблетки гомеопатические, в пачках по 60 и 120 штук. Капли для приема внутрь гомеопатические, во флаконах по 30,50 и 100 мл.
3	«Климадинон», «Климадинон УНО»	Цимицифуга кистевидная	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой, в упаковках по 60 и 90 штук. Капли для приема внутрь, во флаконах по 50 и 100 мл. Таблетки, покрытые пленочной оболочкой, в пачках по 30,60 и 90 штук («Климадинон УНО»).
4	«Ци-клим»	Цимицифуга кистевидная	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой, в упаковках по 20, 40, 60 и 80 таблеток. Капли для приема внутрь, во флаконах по 50 и 100 мл.

1	2	3	4
5	«Клиофит»	Шиповник, Сосна кедровая сибирская, Боярышник, Солодка, Чага, Кориандр, Календула лекарственная, Элеутерококк, Хмель обыкновенный, Анис обыкновенный, Мята перечная, Пустырник, Кипрей, Ромашка аптечная, Тмин обыкновенный, Тысячелистник обыкновенный, Череда, Подорожник большой	Эликсир, в бутылках по 100, 200 и 250 мл.
6	«Лахезис комп»	Красавка обыкновенная, Меркуриалис переннис	Гранулы гомеопатические, в банках и флаконах по 10 грамм.

Количество БАД значительно и часто именно данная группа средств является приоритетной в комплексной терапии и профилактике целевой группы патологий.

Особенно часто в нетрадиционной медицине применяют корневища с корнями родиолы четырехлепестной и траву ортилии однобокой как отдельно, так и в комбинации, которые позиционируются как средства для лечения дисменореи, эндометрита и эндометриоза. О популярности данных ЛР у пациентов свидетельствует количество БАД, которые производятся на их основе. По данным «Реестра свидетельств о государственной регистрации» [75] на сегодняшний день зарегистрировано 12 БАД на основе травы ортилии и 1 сырье (трава) для производства. 10 из них зарегистрировано на территории Алтайского края (г. Барнаул), 2 в г. Иркутске и 1 в г. Санкт-Петербурге. Можно предположить, что такое распределение связано с приуроченностью произрастания и количеством запасов сырья на этих территориях.

БАД на основе родиолы четырехлепестной широко представлены на фармацевтическом рынке РФ [7]. На сегодняшний день в «Реестре свидетельств о государственной регистрации» [75] присутствует 11 БАД и 3

сырья для производства БАД с родиолой четырехлепестной в различных формах (таблица 2).

Таблица 2 - БАД на основе родиолы четырехлепестной на рынке РФ

№	Торговое наименование	Лекарственная форма, дозировка	Производитель
1	2	3	4
1	«Фиточай «Родиола четырехлепестная» (Красная щетка)»	ЛРС, фильтр-пакеты по 2,0 г, пакеты по 40 г	ООО «Чикетаман»
2	«Родиола четырехчленная (красная щетка)»	Сырье для производства БАД к пище от 100 г до 10 кг	ООО «Нарине»
3	«Родиола четырехчленная (красная щетка)- <i>Rhodiola quadrifida</i> , корневище с корнями»	Сырье для производства БАД к пище от 50 г до 50 кг	ООО «Фарм-Продукт»
4	«Фиточай серии «Алтай» «Красная щетка»	ЛРС, пакеты или коробки по 25,0 г	ООО «Фарм-Продукт»
5	«Красная щетка-М» (2 свидетельства регистрации: 06.11.2009 и 15.02.2010)	Таблетки по 0,5	ООО «Алтай-Фарм»
6	«Фиточай «Красная щетка» серии «Алтай-Фарм»	ЛРС, фильтр-пакеты по 1,5 г, пакеты или коробки по 25 г	ООО «Алтай-Фарм»
7	«Красная щетка» серии «Радуга Горного Алтая»	жидкая форма во флаконах по 50 или 100 мл	ООО «Нарине»
8	«Родиола четырехчленная <i>Rhodiola quadrifida</i> -Красная щетка»	Сырье для производства БАД к пище от 100 г до 10 кг	ООО «Фарм-Продукт»
9	«Фиточай «Красная щетка с травами» серии «Травы Горного Алтая»	ЛРС, фильтр-пакеты по 2,0 г, пакеты от 30 г до 100 г	ООО «Зеленый доктор»
10	«Родиола четырехчленная»	измельченное растительное сырье 25г -500г, гранулы 25 г - 500 г, фильтр-пакеты по 2,0г, брикеты массой 2,5;5,0 г	ООО «Компания Хорст»

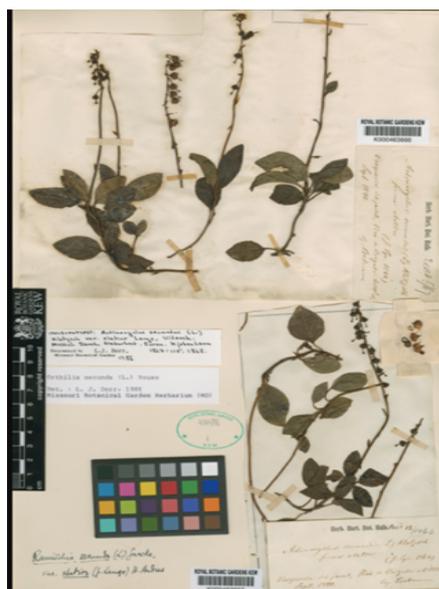
1	2	3	4
11	«Красная щетка»	капли, флаконы по 30 мл, 50 мл, 100 мл	ЗАО «Эвалар»
12	«Красная щетка»	ЛРС пакеты по 30 г, 50 г, 70 г, 100 г; фильтр-пакеты по 2 г; таблетки по 0,5 г	ЗАО «Эвалар»
13	«Родиола четырехчленная - драже»	драже массой 0,3 г	ООО «Компания Хорст»

Значительное число БАД на основе сырья ортилии и родиолы четырехлепестной создают предпосылки для их комплексного фитохимического изучения, последующей стандартизации и проведения доклинических исследований с целью придания официального статуса.

1.3. Фармакогностическая характеристика и степень изученности объектов исследования

1.3.1. Ботаническая характеристика *Orthilia secunda* L.

Род *Orthilia* относится к семейству *Ericaceae* и по данным энциклопедического интернет-проекта The Plant List [76] насчитывает порядка 16 представителей, одним из которых является ортилия однобокая (*Orthilia secunda* (L.)).



Orthilia secunda (L.) House - ортилия однобокая (матка боровая) - многолетнее травянистое растение (рис. 2) [77]. Длина стебля достигает 15 см в высоту, стебель неопушенный, неветвистый. Листья расположены в нижней части растения (розеточные) черешковые, очередные, листовая пластинка овальной или округлой формы длиной 2–3 см, ширина 1–2 см. Край острозубчатый, основание листа в виде клина, верхушка заостренная. Жилкование перисто-сетчатое.

Рисунок 2 - *Orthilia secunda* L.

Подземная сфера представлена корневищем с многочисленными корнями, корневище может

достигать 1 м в длину, ползучее, ветвистое [78]. Цветки полушаровидной формы, зеленовато-белого цвета, собраны в соцветие однобокая кисть. Плод - повислая коробочка [79]. Период цветения ортилии однобокой - июнь-июль, плодоношение - август. Запах слабый. Вкус слегка вяжущий.

1.3.2. Ареал произрастания и заготовка ортилии однобокой

Ортилия однобокая встречается на территории всей Европы (кроме степных районов) [8], Западной и Восточной Сибири. Обнаруживается на территории Канады, США, Мексики, на Курильских островах и в Японии [80]. На территории РФ наиболее распространена в лесной зоне европейской части, по всей Сибири, также в горах Кавказа и на Дальнем Востоке. Ареал распространения (рис. 3) связан с биологическими особенностями вида - большая семенная продуктивность растения и легко разносимые семена. Местообитание - темнохвойные зеленомошные леса, сосновые леса, также встречается в дубовых и буковых лесах, на лугах, вдоль берегов рек, на болотах [78]. Предпочитает небогатые минеральными веществами слабокислые почвы.

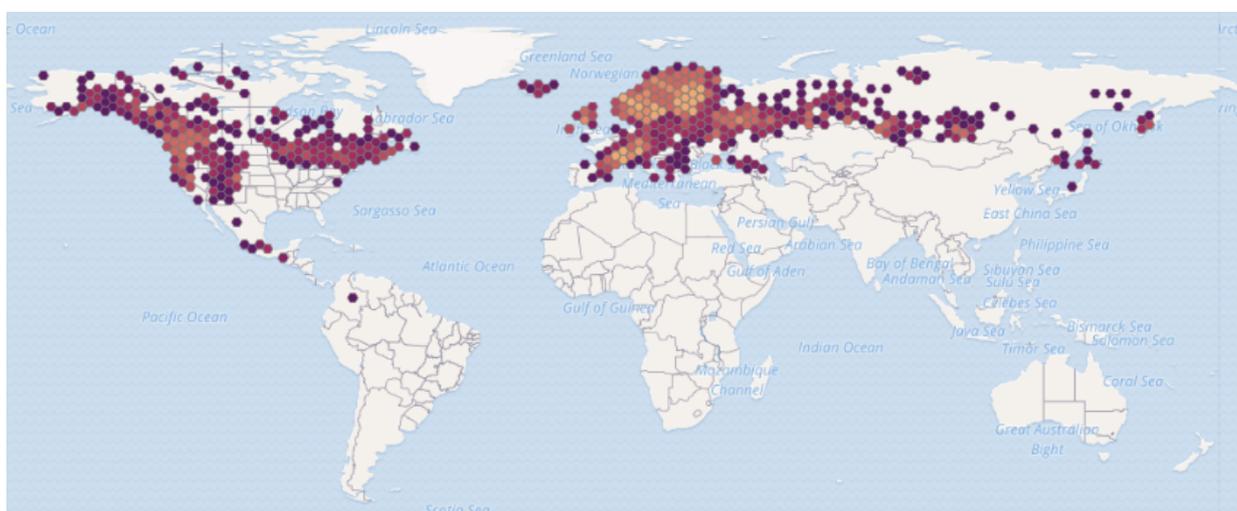


Рисунок 3 – Ареал распространения ортилии однобокой [81]

Orthilia secunda L. дикорастущее растение, но при необходимости возможна его культивирование. Ломбоевой С.С. [11] установлено, что на территории Западного Забайкалья эксплуатационные запасы ортилии однобокой достигают порядка 70 кг (по состоянию на 2005 год). Сырьем

является надземная часть - трава. Заготовку проводят во время цветения или в начале плодоношения, в период июнь — август, когда происходит максимальное накопление БАВ. Срезают стебли на расстоянии 3–4 см от земли, оставляя боковые пазушные почки для возобновления. По данным литературы [11] рекомендуется проводить заготовку сырья на одном и том же месте с периодичностью 4–5 лет, при этом оставляя 20% генеративных побегов. Сушат сырье на воздухе, избегая попадания прямых солнечных лучей. Раскладывают тонким слоем, часто переворачивают [77].

1.3.3. Химический состав травы ортилии однобокой

Данные о фитохимическом составе ортилии незначительны и представлены работами нескольких авторов [8, 11, 79]. Критический анализ данных литературы позволил сделать вывод, что трава ортилии однобокой богата фенольными соединениями такими как арбутин, флавоноиды (кверцетин, кемпферол), гидроксикоричные кислоты (хлорогеновая кислота), фенолкарбоновые кислоты (галловая кислота), иридоиды (монотропеин), в сырье присутствуют дубильные вещества, органические кислоты (аскорбиновая, лимонная, яблочная, янтарная) и аминокислоты (L-аспарагин, L-цистеин, DL-метионин, DL-серин, DL-β-аланин). Количественно было определено содержание дубильных веществ в траве ортилии однобокой (12,6 %), простых фенолов (6,9 %), аскорбиновой кислоты (0,05 %), органических кислот (5,6 %).

Установлено наличие макро- (Ca, Mg, Na) и микроэлементов (Al, Fe, Ba, Zn, Cu, Si, P, Ti), сапонинов, кумаринов, полисахаридов, смол и горечи [11].

1.3.4. Фармакологические эффекты и применение травы ортилии однобокой

Анализ литературных источников показал, что трава ортилии однобокой применяется в народной медицине в качестве противовоспалительного, мочегонного, иммуностимулирующего, кровоостанавливающего, ранозаживляющего и вяжущего средства [8, 79]. В некоторых регионах (Урал, Западная Сибирь) ее применяли как средство для лечения эпилепсии [82].

Стоит отметить, что сырье ортилии однобокой занимает отдельную нишу в лечении заболеваний женской репродуктивной сферы. Существует данные о применении ортилии при эндометритах, нарушениях менструального цикла, опухолевых и спаечных процессах, различных ВЗОМТ, при ЭМ и бесплодии [82,83].

Доказана высокая противовоспалительная активность сухого экстракта ортилии однобокой в эксперименте [84,85]. На белых крысах с моделью острого эндометрита было установлено снижение скорости оседания эритроцитов в крови животных по сравнению с контрольной группой. Также было установлено снижение в сыворотке крови крыс малонового альдегида, что косвенно указывает на способность сухого экстракта ингибировать процесс перекисного окисления липидов, то есть можно предположить, что механизм молекулярно-клеточного действия БАВ экстракта связан именно с этим процессом [86].

1.3.5. Ботаническая характеристика *Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. &C.A. Mey.

Род *Rhodiola* насчитывает более 200 видов [76], которые активно изучаются различными научными группами во всем мире [87-91]. Наиболее известным представителем рода является родиола розовая (*Rhodiola rose* L.), которая применяется в официальной медицине РФ в качестве адаптогенного средства при астеническом синдроме [74] и является фармакопейным ЛРС [92]. Однако на территории Евразии произрастают другие представители рода, которые находят применение в народной медицине [93].

Одним из представителей является родиола четырехлепестная (красная щетка) - *Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. &C.A. Mey. - многолетнее травянистое растение, принадлежащее семейству Толстянковые (*Crassulaceae*). Представляет собой кустарничек высотой до 15 см (рис. 4). Подземная сфера состоит из короткого многоглавого корневища с многочисленными корнями [94]. Корневище плотное, черно-бурое, покрыто бурыми чешуевидными листьями и отмершими побегами. Корни длиной 3–5

см, в диаметре до 1,2 см, поперечно-морщинистые, на верхушке часто многоглавые. Стебли многочисленные, тонкие, 3—7 см высотой, красноватые. Листья 3—8 мм длиной, 1—2 мм шириной, очередные, сидячие, линейно-цилиндрические, цельнокрайние, заостренные, мясистые, окружают соцветия. Соцветие щитковидное, малоцветковое, верхушечное, из 3—5 цветков. Цветки раздельнополые, красные. Чашелистики линейные, бурые, 1—1,5 мм длиной и 0,3—0,4 мм шириной у тычиночных и 2 мм длиной и 0,3 мм шириной у пестичных цветков. Лепестки 2—3 мм длиной, обратнойцевидные, тупые, красные. Тычинки равны лепесткам или незначительно превышают их, с желтыми нитями и пыльниками. Плоды – листовки 3,5—4 мм в длину, 2 мм в ширину, прямые, ланцетные, ярко красные, при созревании – бурые, немного выпуклые, по бокам уплощенные, с тонким, оттянутым назад носиком, в основании на 1/4 сросшиеся. Семена 2 мм длиной, продолговатые, бурые. Запах слабый. Вкус слегка вяжущий [94].



Рисунок 4 - *Rhodiola quadrifida*

Анатомические признаки сырья родиолы четырехлепестной частично описаны в работе Т. Ли [95].

1.3.6. Ареал произрастания и заготовка родиолы четырехлепестной

Родиола четырехлепестная произрастает на территории Китая, Монголии, Тибета, Малой Азии и Западной Сибири, в горах восточного Саяна (рис. 5) [81]. Местообитание - каменистые склоны, щебнистые высокогорья [96]. *Rhodiola quadrifida* - дикорастущее растение, культивируется в Европе и странах Северной Америки [97]. Сырьем является трава и корневища с корнями. Траву заготавливают в фазу цветения или бутонизации, срезают на уровне 2—3 см от земли. Подземную сферу выкапывают поздней осенью после окончания периода вегетации, очищают,

промывают от земли проточной водой, разрезают на куски. Оба вида сырья сушат на воздухе в тени.



Рисунок 5 – Ареал распространения *Rhodiola quadrifida* [81]

1.3.7. Химический состав растений рода Родиола

Для растений рода *Rhodiola* характерно присутствие родоспецифичных фенольных соединений таких как розавин, розарин, родионин, салидрозид, тирозол [98].

Родиола розовая является наиболее изученным представителем рода. Ее химический состав представлен большим количеством групп БАВ: ациклические спирты и их гликозиды, производные бензойной кислоты, фенольные соединения, производные коричневого спирта. Установлено наличие в сырье родиолы розовой родиолозидов А, В, С, D, E, F; розиридина, гидрохинона, 4-гидроксиметилбензоата, галловой, хлорогеновой и розмариновой кислот, кемпферола и др. [99]. В Государственной Фармакопее РФ (ГФ РФ) XIV издания для родиолы розовой нормируется количественное содержание розавина и салидрозида [92]. Также установлено, что *Rhodiola rosea*, заготовленная в разных эколого-фитоценологических зонах имеет разный качественный и количественный химический состав [98].

В работе А. Марчева [99] методом ВЭЖХ доказано отличие химического состава *Rhodiola rosea* (заготовленная в разных регионах) от *Rhodiola kirilowii* и *Rhodiola cernulata*. Авторами установлено, что во всех трех видах присутствует салидрозид в разных количествах, тирозол обнаружен только в *Rhodiola cernulata*. Химический состав данного представителя рода *Rhodiola*

подробно описан в работе Тао Х. [100]. Показано наличие родиолозидов, розидрина, кренулатозида, кофейной, феруловой и ванилиновой кислот, эллаговой кислоты, катехина и эпикатехина, пирогаллола и др.

В гидрофильном экстракте *R. kirilowii* были обнаружены кумарины (эскулетин, умбеллиферон), флавоноиды (гербацитрин и бергенин), родиоцианозид А [87, 101].

Еще один представитель рода *Rhodiola sachalinensis*, отличается тем, что имеет в своем составе специфичные соединения, характерные только для данного вида: сахалол (ациклический спирт), сахалозиды и розиридозиды (гликозиды ациклических спиртов) [100]. Как и у других представителей, обнаружены тирозол, салидрозид, розавин, розин и розарин.

Данные о химическом составе *Rhodiola quadrifida* в научной литературе ограничены. Установлено наличие двух флавоноидов (кверцетина и кемпферола), двух кумаринов (скополетина и умбеллиферона), тирозола и салидрозида [102, 103]. Японскими учеными были выделены родиоцианозиды А и В, родиофлавонозид и родиооктанозид [10]. Формулы данных соединений представлены на рисунке 6.

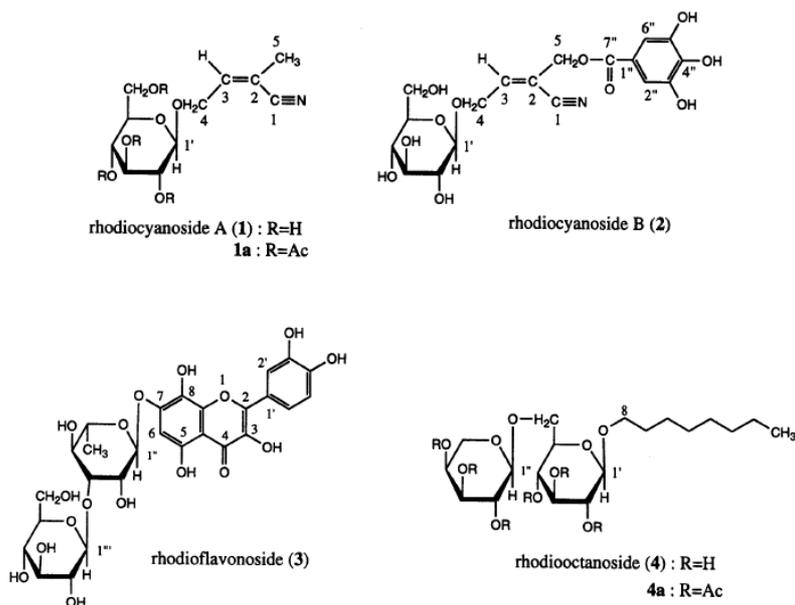


Рисунок 6 – Химические соединения родиолы четырехлепестной [10]

1.3.8. Фармакологические эффекты и применение растений рода родиола

Фармакологические аспекты применения растений рода *Rhodiola* широко известны во всем мире [104]. Традиционно применяются в качестве адаптогенных и противовоспалительных средств. Одним из наиболее популярных и хорошо изученных представителей является родиола розовая, которая в РФ является официальным видом. В РФ зарегистрировано 2 ЛП на основе родиолы розовой [74]. Первый – родиолы экстракт жидкий, который применяется в качестве адаптогенного средства при астенических состояниях, при повышенной утомляемости, нарушении концентрации внимания. Второй – родиолы розовой корневища и корни, который по фармако-терапевтической группе относится к общетонизирующим средствам растительного происхождения [105]. В странах Европы, Азии и США родиола розовая применяется в качестве БАД при схожих состояниях [9]. Антиоксидантное действие сырья родиолы розовой указано в работе О. Kosakowska [106]. Установлено также гепатопротекторное, иммуностропное, противовирусное и противовоспалительное действие [107].

Родиола разнозубчатая (*Rhodiola heterodonta* Hook & Thomson) Boriss.) применяется в народной медицине Китая и Тибета в качестве противовоспалительного, адаптогенного и вяжущего средства [108]. А *R. kirilowii* на территории Китая применяется в качестве обезболивающего средства, а также для нормализации менструального цикла [109]. Сырье *R. yunnanensis* используется при ревматизме, мастите, фурункулах [110].

Корневища и корни родиолы четырехлепестной активно применяются в народной медицине РФ при заболеваниях женской репродуктивной системы в качестве БАД. Существуют данные о применении родиолы при заболеваниях мочевыводящих путей [111]. В Китайской традиционной медицине родиола четырехлепестная применяется как гемостатическое, противокашлевое и тонизирующее средство [10].

Фармакологические эффекты сырья находятся в прямой зависимости от химического состава растения. Доказано, что салидрозид оказывает противовоспалительное, антиоксидантное и антиканцерогенное действие [112]. Исследование G. Zhao подтверждает ингибирующее действие салидрозид на пролиферацию клеток молочной железы, а также индукцию апоптоза раковых клеток *in vitro* и подавление роста опухоли в эксперименте *in vivo* [113]. Ряд авторов указывают на антигистаминное действие метанольного экстракта родиолы четырехлепестной за счет ингибирования реакций высвобождения гистамина. Авторы [10] доказали, что данный фармакологический эффект оказывают БАВ, выделенные из метанольного экстракта, а именно цианогликозиды - родиоцианозиды А и В.

Выводы к главе 1

1. Критический анализ данных литературы позволил заключить, что фитотерапия занимает определенную нишу в лечении ряда социально-значимых заболеваний и количество растительных препаратов в ассортименте аптечных сетей имеет тенденцию к росту (прогнозируемый прирост 6,6% в год).

2. Наблюдается тенденция к ежегодному росту числа гинекологических заболеваний (33% и 13% от онкологических заболеваний женщин приходится на рак молочной железы и рак шейки матки). Причем наиболее подвержены риску женщины репродуктивного возраста (у 10-15% диагностирован эндометриоз), что негативно сказывается на демографии и способствует поиску целевых лекарственных средств. Существующие методы лечения гинекологических патологий достаточно эффективны, но вызывают ряд ПЭ со стороны других органов и систем, что создает предпосылки смещения терапевтического профиля в сторону включения в листы назначений лекарственных растительных препаратов (ЛРП).

3. Данные литературы и государственных реестров дают возможность сделать вывод, что сырье родиолы четырехлепестной и ортилии однобокой активно применяется в народной медицине в качестве БАД в комплексном лечении заболеваний гинекологического профиля.

4. Литературные данные о химическом составе родиолы четырехлепестной и ортилии однобокой малочисленны и не носят системного характера, что не дает возможности выделить целевые группы БАВ и разработать критерии стандартизации данных растений.

5. В результате литературного обзора научных публикаций по целевым растениям – объектам исследования можно заключить, что комплексное фитохимическое изучение травы ортилии однобокой и корневищ и корней родиолы четырехлепестной с последующей стандартизацией сырья и разработкой нормативной документации для введения ЛРС в официальную медицину является актуальным направлением.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

В качестве объектов исследования использовали воздушно-сухую траву ортилии однобокой, заготовленную в фазе цветения в различных эколого-фитоценологических зонах:

- в районе г. Кокшетау (север Республики Казахстан 53.2810N, 69.3888E) период заготовки – июнь 2018 года;
- Пермский край, Березовский район (57.6209N, 57.6455E), период заготовки - июль 2019 года;
- Тюменская область, Сладковский район (55.5664N, 70.2314E), период заготовки - июль 2019 года.

Надземную часть срезали на уровне 3–4 см от земли, избегая попадания грубых частей. Сушили воздушно-теневым способом под навесами, постоянно переворачивая.

Вторым объектом служили подземные органы - корневища и корни – 3 видов рода *Rhodiola*: *Rh. rosea*, заготовленная в Питомнике СПХФУ в пос. Лемболово (Ленинградская область) в августе-сентябре 2020 года; *Rh. quadrifida*, приобретенная в аптечной сети г. Санкт-Петербурга (место и время заготовки по информации на упаковке – Алтай (в районе г. Барнаул), март 2019 года) и заготовленная в конце октября 2021 года на Алтае (район г. Барнаул); *Rh. heterodonta*, заготовленная в Таджикистане (район г. Душанбе) в марте 2019 года. Сырье выкапывали, очищали от стеблей и листьев, промывали в проточной воде и сушили методом воздушно-теневого сушки, избегая попадания прямых солнечных лучей.

Идентификацию заготовленного сырья проводили с помощью специалистов кафедры фармакогнозии ФГБОУ ВО СПХФУ. Подлинность *Rh. quadrifida*, приобретенной в аптеке была подтверждена сертификатом качества на БАД.

Внешний вид объектов исследования представлен в таблице 3.



Ортилия однобокая



Р. четырехлепестная (БАД)



Р. четырехлепестная цельная



Р. розовая цельная



Р. разнотубчатая измельченная

Таблица 3 – Внешний вид объектов исследования

2.2. Методы исследования

2.2.1. Методы определения подлинности и доброкачественности ЛРС

2.2.1.1. Определение макро- и микроскопических признаков сырья (подлинность)

Изучение объектов исследования по показателям подлинности - внешний вид и анатомо-диагностические особенности - проводили в соответствие с ГФ РФ XIV ОФС.1.5.1.0002.15 «Травы», ОФС.1.5.1.0006.15 «Корни, корневища, луковичи, клубни, клубнелуковичи» и ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования ЛРС и лекарственных растительных препаратов» [92].

Внешние признаки сырья определяли невооруженным глазом и с помощью лупы при 10-кратном увеличении.

Анатомо-диагностические признаки объектов исследования изучали на поперечных срезах и препаратах с поверхности (для травы ортилии). Препараты листа с поверхности ортилии однобокой получали с предварительно размягченного и просветленного в 5% растворе натрия гидроксида сырья.

Пробоподготовку корневищ с корнями родиолы четырехлепестной проводили по методике, применяемой в лаборатории анатомии и морфологии ФГБУН БИН РАН им. Комарова [114]. Для получения поперечного среза траву ортилии предварительно размягчали в воде в течение 2 часов, а после выдерживали в смеси спирта этилового 96%-глицерина-воды в соотношении 1:1:1 в течение 5 дней.

Полутонкие срезы (2–4 мкм) получали с помощью прибора Ultracut E (Reichert-Jung). Поперечные срезы корневища обрабатывали реактивами для гистохимической идентификации [92]: 0,5% спиртовым раствором флороглюцина и серной кислоты раствором 25%, раствором судан III и раствором толуидина. Наличие крахмала в стеблях ортилии подтверждали с помощью раствора Люголя.

Готовые микропрепараты исследовали с помощью бинокулярного цифрового микроскопа марки «Zeiss» (Германия): Axio Scope.A1 для биологии с увеличениями $\times 10$, $\times 20$, $\times 40$, $\times 200$, $\times 400$, $\times 800$ и фотографировали с помощью встроенного фотоаппарата с цифровой камерой AxioCam MRc5. Обработку полученных результатов осуществляли с применением специализированного ПО Zen 2011.

2.2.1.2. Определение числовых показателей (доброкачественность) и технологических параметров сырья

Фармакопейные показатели качества (зола общая; зола нерастворимая в растворе 10% хлористоводородной кислоты; степень измельченности; содержание примесей; содержание экстрактивных веществ; влажность) устанавливали в соответствии с методиками, указанными в ГФ РФ XIV издания по ОФС.1.2.2.2.0013.15 «Общая зола»; ОФС 1.5.3.0005.15 «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»; ОФС 1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»; ОФС 1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»; ОФС 1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» [92].

Определение технологических параметров проводили по методикам приведенным в литературных источниках [92, 115, 116].

2.2.2 Методы фитохимического анализа объектов исследования

2.2.2.1. Методика приготовления извлечений

Для проведения скрининговых фитохимических исследований готовили извлечения по следующей методике. Навеску измельченного ЛРС (диаметр частиц 5–7 мм) помещали в круглодонную колбу, вносили растворители различной полярности (воду очищенную; спирт этиловый 40%, 70%, 96%; 0,1 М хлористоводородную кислоту) в соотношении 1:4. Экстракцию проводили на кипящей водяной бане ($t=100^{\circ}\text{C}$) с обратным холодильником в течение часа.

По окончании экстракции, полученный раствор охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через бумажный фильтр. Бумажный фильтр с частичками сырья помещали к сырью в колбе и проводили повторную экстракцию новой порцией растворителя. Полученные извлечения объединяли, отстаивали в холодильнике 24 часа (кроме спиртового 96%), фильтровали, концентрировали в вакууме до 1/3 первоначального объема. Готовый раствор использовали для проведения скрининговых исследований на установление отдельных групп БАВ с помощью качественных реакций и высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ). Водное извлечение использовали для идентификации аминокислот, органических кислот, дубильных веществ; солянокислое только для аминокислот. Водно-спиртовой раствор 70% - для определения флавоноидов и сапонинов; 40% - для ФКК, ГКК; в 96% устанавливали кумарины и иридоиды.

2.2.2.2. Предварительный фитохимический скрининг групп БАВ с помощью качественных реакций

Определение групп БАВ в извлечениях проводили с помощью групповых качественных реакций по методикам представленным в литературе [117,118]. Наличие аминокислот устанавливали по специфичной реакции со спиртовым раствором нингидрина 1%; идентификацию моно- и полисахаридов проводили по реакциям с реактивом Фелинга, α -нафтолом и этанолом 96%; флавоноиды определяли по реакциям с алюминия хлоридом раствором 2% спиртовым, с железа (III) хлорида раствором 10%, калия гидроксидом раствором спиртовым 10%, цианидиновой реакцией; дубильные вещества открывали реакцией с раствором желатина 1% и железоаммонийными квасцами; на производные бензойной кислоты проводили реакцию с железа (III) хлорида раствором 3%; лактонную пробу использовали для обнаружение кумаринов; сапонины устанавливали с помощью специфичных реакций (пенообразования, Лафона, Сальковского, Санье, реакции с раствором ацетата свинца 10%).

2.2.2.3. Хроматографический скрининг маркерных групп БАВ

Для определения различных групп БАВ использовали методы ТСХ и ВЭТСХ. Тонкослойную хроматографию проводили на пластинках «Sorbfil UV₂₅₄» (ПТСХ-П-В-УФ 10×20, зернение силикагеля 5–17 мкм, толщина слоя 110 мкм) производства АО «Сорбполимер», Россия. Высокоэффективную тонкослойную хроматографию осуществляли на приборе САМАГ с УФ-кабинетом, на пластинах Merck HPTLC silica gel 60 F154, 20×10. Пробы наносили при помощи полуавтоматического аппликатора Linomat 5. Элюирование пластин осуществляли в автоматической камере САМАГ Automatic Developing Chamber (ADC2). Установка параметров и обработка результатов осуществлялась в программе VisionCATS.

Для хроматографических исследований были использованы различные системы растворителей, рекомендованные литературой [119-123]:

1. н-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2);
2. этилацетат – муравьиная кислота – вода (3: 1: 1);
3. этилацетат – муравьиная кислота – вода – ледяная уксусная кислота (100:11:26:11);
4. этанол – ацетон (3:7);
5. толуол – этилацетат – муравьиная кислота – вода (10:20:5:2);
6. этилацетат – метанол – вода – муравьиная кислота (77:13:10:2);
7. хлороформ – метанол (9:1);
8. бензол – этилацетат – уксусная кислота (50:50:1);
9. уксусная кислота разведённая 5%;
10. уксусная кислота разведённая 15%;
11. этилацетат – муравьиная кислота – вода (20:2:3);
12. этилацетат – муравьиная кислота – вода (88:6:6).

Растворители, использованные для приготовления систем, соответствовали квалификациям «х.ч.» и «ч.д.а.»

Зоны адсорбции отдельных БАВ идентифицировали по окраске в дневном свете и по их флуоресценции в фильтрованном УФ-свете при двух

длинах волн (254, 366 нм) на облучателе УФС-254/365 (ООО "Имид", Россия) до и после обработки различными реактивами. Идентификацию проводили по сравнению с коэффициентом подвижности (Rf) соответствующих стандартных образцов. Растворы для детектирования (таблица 4) готовили в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV, ОФС 1.3.0001.15 «Реактивы. Индикаторы» [92].

2.2.2.4. Методы количественного определения БАВ

А. Определение галловой кислоты (ГК) в траве ортилии однобокой с расчетом по методу Фирордта. Содержание галловой кислоты устанавливали спектрофотометрическим методом по методике, приведенной в литературе [124].

Аналитическую навеску сырья ортилии однобокой (точная, около 5 г) измельченного (5-7 мм) сырья помещали в коническую колбу, экстрагировали водой ($t=100^{\circ}\text{C}$) в количестве 200 мл, затем проводили экстракцию на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут, периодически перемешивая. Полученное извлечение снимали с водяной бани и сразу процеживали через несколько слоев марли в мерную колбу вместимостью 200 мл, доводили объем раствора водой до метки (раствор А). 1 мл полученного раствора переносили с помощью мерной пипетки в мерную колбу объемом 25 мл, доводили до метки боратным буферным раствором с рН 9,0 (раствор Б). Из 25 мл раствора брали аликвоту 1 мл и помещали в мерную колбу на 10 мл, доводили до метки буфером (раствор С). Трижды измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре СФ-2000 (ООО «ОКБ СПЕКТР», Россия) в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали боратный буферный раствор с рН 9,0 при длинах волн 275 ± 2 нм и 305 ± 2 нм.

Предварительно регистрировали УФ-спектры для идентификации целевых максимумов.

Таблица 4 – Условия проведения хроматографического анализа (ТСХ, ВЭТСХ) основных групп БАВ в извлечениях из изучаемых видов сырья

Группа БАВ (извлечение, вид хроматографии, система)	Растворы для идентификации	Стандартные образцы (СО)
1	2	3
Аминокислоты (водное и солянокислое извлечения) ТСХ в системе 1	0,1% спиртовой раствор нингидрина с последующим нагреванием при 100-105°C (реактив А)	водные растворы аргинина, аспарагина, глутаминовой кислоты, глицина, метионина (СТХ ГОСТ) (С=0,1%)
Органические кислоты (водное извлечение) ТСХ в системах 1, 2	смесь бромфенолового синего и метилового красного в метаноле (реактив Б)	водные растворы кислот: винной, лимонной, янтарной, щавелевой, яблочной, аскорбиновой (СТХ ГОСТ) (С=0,1%)
Терпеновые соединения (96% спиртовое извлечение) ТСХ в системах 4, 7	реактив Шталя (реактив В), реактив Трим-Хилла (реактив Г)	—
Фенольные соединения (70% спиртовое извлечение) ВЭТСХ в системе 12	флуоресценция в УФ-свете	спиртовые растворы арбутина (С=5 мг/мл) (аналитический стандартный образец, Sigma-Aldrich), галловой кислоты (С=2 мг/мл) (сертифицированный стандартный образец, TraceCERT®) и гидрохинона (С=2,5 мг/мл) (вторичный фармацевтический стандартный образец, Merck)

Продолжение таблицы 4

1	2	3
<p>Флавоноиды (70% спиртовое извлечение) ВЭТСХ в системах 1, 3, 8, 11</p>	<p>флуоресценция в УФ-свете</p>	<p>спиртовые растворы рутина (C=0,1 мг/мл) (рутозида тригидрат EP CRS), кверцетина (C=0,1 мг/мл) (вторичный фармацевтический стандартный образец, Merck), кемпферола (C=0,05 мг/мл) (вторичный фармацевтический стандартный образец, Merck), лютеолина (C=0,1 мг/мл) (аналитический стандартный образец, Merck), гиперозида (C=0,01 мг/мл) (вторичный фармацевтический стандартный образец), циннарозида (C=0,1 мг/мл) (аналитический стандартный образец, Merck), мирицетина (C=0,41 мг/мл) (особо чистый $\geq 96.0\%$ методом ВЭЖХ, LGC), апигенина (C=0,1 мг/мл) (особо чистый $\geq 95.0\%$ методом ВЭЖХ, Merck)</p>
<p>ГКК (40% и 70% спиртовое извлечение) ВЭТСХ в системах 1, 5, 9, 10</p>	<p>флуоресценция в УФ-свете; обработка парами аммиака</p>	<p>метанольные растворы кислот: кофейной (C=0,98 мг/мл), хлорогеновой (C=1,07 мг/мл), п-кумаровой (C=1,00 мг/мл), синаповой (C=1,02 мг/мл), розмариновой (C=1,94) и коричной (C=1,02 мг/мл). Все СО EP CRS (Sigma-Aldrich).</p>

1	2	3
ФКК (70% спиртовое извлечение) ВЭТСХ в системах 5, 10	флуоресценция в УФ-свете	метанольные растворы СО протокатеховой (C=1,02 мг/мл), сиреневой (C=1,04 мг/мл) и ванилиновой кислот (C=1,00 мг/мл). Все СО EP CRS (Sigma-Aldrich).
Фенольные спирты и их гликозиды (для растений рода <i>Rhodiola</i> - метанольное извлечение) ВЭТСХ в системе 6	флуоресценция в УФ-свете; анилин-дифениламин ¹ (реактив Д)	метанольные растворы СО салидрозида (C=1,00 мг/мл) (аналитический стандартный образец, Sigma-Aldrich), тирозола (C=2,00 мг/мл) (аналитический стандартный образец, Sigma-Aldrich), розарина (C=1,00 мг/мл) (аналитический стандартный образец, Merck)

¹ -Приготовление реактива: 4.0 г дифениламина растворяют в 160 мл ацетона, с осторожностью добавляют 4 мл анилина и 30 мл о-фосфорной кислоты.

Содержание ГК в пересчете на абсолютно сухое сырье (%) определяли по методу Фирордта по формулам (1, 2), приведенным в источнике [124].

$$C_{\text{ГК}}, \% = \frac{A_2^{\lambda 2} \times A_1^{\lambda 1} - A_2^{\lambda 1} \times A_1^{\lambda 2}}{(A_1^{\lambda 1} \times A_2^{\lambda 2} - A_1^{\lambda 2} \times A_2^{\lambda 1}) \times l} = \frac{619,43 \times A_1^{\lambda 1} - 348,99 \times A_1^{\lambda 2}}{(426,44 \times 619,43 - 141,804 \times 348,99)} = \frac{619,43 \times A_1^{\lambda 1} - 348,99 \times A_1^{\lambda 2}}{0,21 \times 10^6}, (1)$$

где

$C_{\text{ГК}}$ - концентрация ГК

$A_1^{\lambda 1}$ - величина удельного показателя поглощения ГК при 275 нм, равная 426,44;

$A_1^{\lambda 2}$ - величина удельного показателя поглощения ГК при 305 нм, равная 141,804;

$A_2^{\lambda 1}$ - величина удельного показателя поглощения танина при 275 нм, равная 348,99;

$A_2^{\lambda 2}$ - величина удельного показателя поглощения танина при 305 нм, равная 619,43;

$A^{\lambda 1}$ - оптическая плотность исследуемого извлечения при длине волны 275±2 нм;

$A^{\lambda 2}$ - оптическая плотность исследуемого извлечения при длине волны 305±2 нм;

l - толщина слоя, см³

$$X_{\text{ГК}}, \% = \frac{C_{\text{ГК}} \times V_{\text{МК1}} \times V_{\text{МК2}} \times V_{\text{МК3}} \times 100}{a \times (100 - W) \times V_{a1} \times V_{a2}} = \frac{C_{\text{ГК}} \times 200 \times 25 \times 10 \times 100}{a \times (100 - W) \times 1 \times 1} = \frac{C_{\text{ГК}} \times 0,5 \times 10^7}{a \times (100 - W)}, (2)$$

где

$X_{\text{ГК}}$ - содержание ГК, %;

$V_{\text{МК1}} - V_{\text{МК3}}$ - объем мерных колб, взятых для разведения, мл;

a - масса сырья, г;

W - потеря в массе при высушивании сырья, %;

V_{a1} и V_{a2} - объемы аликвот извлечения, мл.

В. Определение суммы полифенольных соединений в пересчете на ГК в траве ортилии однобокой [124]. Аналитическую пробу измельченного сырья (размер частиц 5–7 мм) около 5,0 г (точная навеска) помещали в круглодонную колбу со шлифом, добавляли 50 мл 40% спирта этилового, экстрагировали на водяной бане с обратным холодильником в течение 30

минут. Затем извлечение процеживали через ватный тампон, не дожидаясь его охлаждения. Вату переносили в колбу для экстрагирования и туда же помещали 25 мл 40% спирта этилового. Экстракцию проводили дважды, в описанных выше условиях, по 15 мин. Полученные вытяжки объединяли и количественно переносили в мерную колбу 100 мл, доводили объем извлечения до метки растворителем. 1 мл полученного раствора помещали в мерную колбу на 25 мл, доводили объем 40% спиртом этиловым до метки и перемешивали. Аликвоту 1мл из полученного раствора, переносили в мерную колбу объемом 10 мл, доводили до метки спиртом этиловым 40%, перемешивали. Трижды измеряли абсорбцию полученного раствора на приборе СФ-2000 (ООО «ОКБ СПЕКТР», Россия) при длине волны 270 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали растворитель - 40% спирт этиловый.

Содержание суммы полифенольных соединений в пересчете на галловую кислоту в абсолютно сухом сырье вычисляли по формуле (3):

$$X_{\text{ПФС}}, \% = \frac{A \times V_{\text{МК1}} \times V_{\text{МК2}} \times V_{\text{МК3}} \times 100}{A_{1\text{см ГК}}^{1\%} \times a \times (100 - W) \times V_{a1} \times V_{a2}} = \frac{A \times 100 \times 25 \times 10 \times 100}{540 \times a \times (100 - W) \times 1 \times 1} = \frac{A \times 0,25 \times 10^7}{540 \times a \times (100 - W)}, \quad (3)$$

где

$A_{1\text{см ГК}}^{1\%}$ - показатель удельного поглощения раствора кислоты галловой в 40% спирте при длине волны 270 нм, равный 540;

A - оптическая плотность испытуемого раствора;

a - масса навески, г;

$V_{\text{МК1}} - V_{\text{МК3}}$ - объем мерных колб, взятых для разведения, мл;

V_{a1} и V_{a2} - объемы алиquot извлечения, мл.

С. Количественное определение родоспецифичных фенольных соединений в растениях рода *Rhodiola* методом ВЭЖХ

Пробоподготовку (получение извлечений) и приготовление фосфатного буфера проводили в соответствии с ГФ РФ XIV, ФС.2.5.0036.15 «Родиолы розовой корневища и корни» [92].

Приготовление растворов СО салидрозида (тирозола). Точную навеску 200 мг СО салидрозида и/или тирозола растворяли в спирте этиловом 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл, объем раствора доводили до метки тем же растворителем и перемешивали (раствор А СО салидрозида (тирозола)).

1 мл раствора А СО салидрозида (тирозола) переносили в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивали (раствор Б СО салидрозида (тирозола) - $C = 0,02$ мг/мл).

Анализ проводили с использованием системы жидкостного хроматографа FlexarFX-15 с УФ детектором (PerkinElmer, США). Колонка Zorbax C18, 250 x 4,6 x 5 мкм. Хроматографические условия анализа приведены в ФС.2.5.0036.15 [92] за исключением длины волны детектирования ($\lambda=220$ нм) и объема вводимой пробы – 20 мкл.

Содержание каждого родоспецифичного фенольного соединения в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{S_1 \times C_0 \times P \times 100 \times 100 \times 100\%}{S_0 \times a_1 \times 100 \times (100 - W)} = \frac{S_1 \times C_0 \times P \times 100 \times 100\%}{S_0 \times a_1 \times (100 - W)},$$

где

S_1 - площадь пика соответствующего соединения в испытуемом растворе;

S_0 - площадь пика соответствующего СО;

C_0 - концентрация соответствующего СО, г/мл,

a_1 - навеска сырья, г

P – содержание соответствующего соединения в СО, %

W - влажность сырья, %

Д. Количественное определение арбутина в траве ортилии методом ВЭЖХ проводили по валидированной методике, представленной в Европейской Фармакопее 10.0 [125].

Приготовление раствора СО арбутина: около 50 мг арбутина (точная навеска) растворяли в ПФ метанол-вода 10:90 в мерной колбе вместимостью 50,0 мл и доводили до метки тем же раствором.

Раствор СО гидрохинона: 2,5 мг гидрохинона (точная навеска) растворяли в ПФ в мерной колбе на 10 мл и доводили до метки ПФ.

Стандартный раствор. К 5,0 мл раствора СО гидрохинона прибавляли 2,5 мл раствора СО арбутина и доводили до объема 10,0 мл ПФ (раствор А).

1,0 мл раствора А помещали в мерную колбу на 10 мл и доводили ПФ до метки (раствор В).

Пробоподготовку проводили по следующей схеме: около 5,0 грамм (точная навеска) порошка травы ортилии помещали в колбу для экстракции. Экстрагировали 25 мл воды очищенной на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут. Колбу охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через вату. После фильтрования ватный тампон помещали в колбу к остатку порошка и добавляли новую порцию 25 мл воды очищенной. Экстракцию повторяли. Новую порцию экстракта охлаждали до комнатной температуры и фильтровали через бумажный фильтр. Фильтраты объединяли, доводили водой очищенной в мерной колбе до 50,0 мл. 1,0 мл извлечения с помощью автоматического дозатора (диапазон 100–1000 мкл, дискретность 5 мкл, Финляндия, ВЮНИТ) количественно переносили в мерную колбу на 25,0 мл, доводили водой очищенной до метки и тщательно перемешивали.

Хроматографические условия: Детектор диодноматричный SPD-M20A, колонка Intersil C18 (250×4,6 мм, 5 мкм) (Phenomenex, США). Температура термостата колонки 30°C, объем вводимой пробы 20 мкл. Скорость потока элюента 1,2 мл/мин. Подвижная фаза (ПФ) - метанол: вода (10:90). Детектирование осуществляли при длине волны $\lambda=280$ нм.

Расчет количественного содержания (X) арбутина (%) проводили по формуле:

$$X = \frac{S_1 \times a_{co} \times 50 \times 25 \times 2,5 \times 1 \times P \times 100 \times 100}{S_2 \times a_1 \times 1 \times 50 \times 10 \times 10 \times (100 - W) \times 100} = \frac{S_1 \times a_{co} \times 62,5 \times P}{S_2 \times a_1 \times (100 - W)}$$

где

S_1 – площадь пика арбутина на хроматограмме испытуемого раствора;

S_2 – площадь пика арбутина на хроматограмме стандартного раствора;

a_1 – навеска ЛРС, г;

a_{co} – навеска СО арбутина, г;

P – содержание основного вещества арбутина в СО, %;

W – влажность ЛРС, %.

Обработку результатов проводили с помощью программы LabSolution.

Е. Количественное определение ГКК в сырье родиолы разнозубчатой методом УФ-спектрофотометрии [92]

Методика: Точную навеску 0,5 г измельченных корневищ и корней родиолы помещали в круглодонную колбу со шлифом, прибавляли 50 мл спирта этилового 70 %. Экстрагировали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин, периодически перемешивая. После охлаждения до комнатной температуры извлечение фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу объемом 100 мл. Экстрагирование повторяли дважды. Раствор, полученный в ходе второй экстракции, фильтровали в ту же мерную колбу. Объединенные извлечения доводили спиртом этиловым 70 % до метки и перемешивали (раствор А).

2,0 мл полученного раствора А количественно переносили в мерную колбу объемом 25 мл, доводили объем раствора спиртом этиловым 96 % до метки и перемешивали (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре «СФ-2000» (ЗАО «ОКБ Спектр», г.С.-Петербург) при длине волны 330 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали спирт этиловый. Содержание суммы оксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{A \times 100 \times 25 \times 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \times a \times 2 \times (100 - W)} = \frac{A \times 125000}{A_{1\text{см}}^{1\%} \times a \times (100 - W)}$$

где

A– оптическая плотность раствора Б;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты при 330 нм, равный 507;

a– навеска сырья, г;

W– влажность сырья, %.

Ф. Определение минерального состава изучаемых видов сырья

Макро- и микроэлементный состав растений – объектов исследования устанавливали методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на приборе «Optima 8000» (Perkin Elmer Inc., США).

Пробоподготовка сырья исследуемых видов растений проводилась в соответствии с указаниями ПО прибора и ГФ РФ XIV ОФС 1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [92] по следующей схеме: точную навеску сырья, около 600 мг помещали в специальный сосуд (бомбу), прибавляли 10 мл концентрированной азотной кислоты (Nitric acid - Puriss. p.a., 65% ($Hg \leq 0.0000005\%$), $\geq 65\%$ (Т), Honeywell Fluka, Germany) и 6 мл концентрированного перекисида водорода. Бомбу герметично закупоривали и подвергали обработке микроволнами в системе Speedwave Entry (Berghof GmbH, Germany) DAP-60 К. Полученный остаточный раствор количественно переносили в мерную колбу объемом 100 мл, доводили до метки водой для хроматографии. Параметры прибора «Optima 8000»: скорость подачи образца составляла 1,5 мл/мин; аксиальное положение обзора эмиссии; время интегрирования от 3 до 5 сек; число повторов интегрирования – 3, диапазон длин волн 213-770 нм; скорость потока плазмообразующего газа - 10 л/мин; скорость потока дополнительного газа - 0,2 л/мин; скорость потока газа для распыления пробы - 0,55 л/мин и мощность плазмы - 1300 Вт.

В соответствии с рекомендациями ПО прибора и ГФ РФ XIV, ОФС 1.2.1.1.0004.15 «Атомно-эмиссионная спектроскопия» [92] проводили обработку и интерпретацию полученных результатов.

В работе для градуировки прибора «Optima 8000» использовали СО мультиэлементного² стандарта (Perkin Elmer, США) и СО ртути в 5% растворе

² - мультиэлементный стандарт содержит элементы: *Ag, Al, As, Ba, Be, Bi, Ca, Cd, Co, Cr, Cs, Cu, Fe, Ga, Hg, In, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Se, Sr, Tl, Zn, U, V*

разведенной азотной кислоты (ООО «ЦСОВВ», Россия) в концентрации $C = 10$ мкг/мл.

2.2.3. Выделение и установление структуры индивидуальных соединений корневищ с корнями родиолы четырехлепестной

2.2.3.1. Получение отдельных фракций

Навеску сырья массой 600 г, измельченного до размера частиц 5- 7мм, помещали в реактор, экстрагировали 70% спиртом этиловым в соотношении сырье-экстрагент 1:10 методом мацерации при комнатной температуре 3 раза в течение 24 ч каждый раз (общее время – 72 часа), каждый раз декантируя извлечение. Водно-спиртовые вытяжки объединяли, упаривали в вакуум-ротационном аппарате (Heidolph, Германия) до водного остатка. Полученную вытяжку отстаивали в холодильнике 12 часов. Образовавшийся осадок отфильтровывали. Полученную водную вытяжку подвергали последовательной трехкратной жидкостно-жидкостной экстракции (соотношение водного извлечения и экстрагента 3:1) органическими растворителями (квалификация «х.ч.», АО «Вектон», Россия) различной полярности в делительной воронке:

- гексаном;
- этилацетатом;
- н-бутанолом.

Экстрагирование веществ каждым растворителем проводили в течение 10 минут.

В результате последовательной жидкость-жидкостной экстракции были получены 4 фракции: гексановая (ГФ), этилацетатная (ЭФ), бутанольная (БФ) и водная (ВФ). Все фракции уменьшали в объеме посредством концентрирования в вакууме.

Каждую полученную фракцию анализировали для определения хроматографического профиля аналитической ВЭЖХ на приборе Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония) колонка Supelcosil C18 (250 x 4,6, 5 мкм), детектор диодноматричный SPD-M20A. Подвижная фаза: А - 0,1% об. ТФУ в

сверхчистой H₂O; В - 0,1% об. ТФУ в ацетонитриле класса «grade for HPLC», температура термостата - 40°C, скорость подвижной фазы – 1 мл/мин. Режим элюирования: 0-5 мин 5% В (изократический режим); 5-45,75 мин 100 % В (линейный градиент), 45,75- 50 мин 100% В (изократический режим), 50-60 мин 5% В (градиентный режим), 60-65 мин 5% В (изократический режим, приведение колонки в равновесие).

2.2.3.2 Выделение индивидуальных соединений

Выбранную по результатам оценки профиля (количество пиков веществ и их интенсивность) ЭФ использовали для выделения индивидуальных веществ методами колоночной и препаративной хроматографии.

На стеклянную открытую колонку, заполненную сорбентом Dianion® HP-20 (Supelco, Sigma-Aldrich, Япония) для адсорбционной очистки наносили ЭФ, затем элюировали спиртом этиловым с повышением концентрации от 10% до 50% (шаг 10%). Контроль очистки и разделения компонентов фракции изучали методом ТСХ (в системе 1) на пластинках Silica gel F₂₅₄ (Merck, Германия). Подфракции со схожим компонентным составом (количество, цвет и R_f пятен) объединяли, упаривали на вакуумно-ротационном испарителе при 60°C до 10 мл. Полученную фракцию для дополнительной очистки наносили на колонку, заполненную сорбентом Sephadex LH-20 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеция) и элюировали спиртом этиловым 96%. Компонентный состав полученных очищенных извлечений изучали методом ТСХ, подфракции с одинаковым числом компонентов - объединяли и упаривали. Очищенное извлечение подвергали хроматографическому разделению на хроматографе Smartlina (Knauer, Германия), оборудованном спектрофотометрическим детектором при длине волны 235 нм. Колонка для препаративной хроматографии - Kromasil C18 (25 см × 30 мм, с размером частиц 5×10⁻³ мм). Скорость потока спирта этилового 96% - 40 мл/мин. Подвижная фаза: вода для хроматографии с содержанием ТФУ 0,1 % (v/v) (PanReac AppliChem, Германия) (компонент А) и ацетонитрил HPLC Far UV/Gradient Grade (J.T. Baker, США) с добавлением 0,1% (v/v) ТФУ (компонент В). Элюирование

проводили в градиентном режиме с 1 по 5 минут 5% компонент В (изократический режим), с 5,0 по 40 минут 5-60% В (линейный градиент), с 40,0 до 45,0 минуты 5% В (изократический режим, приведение колонки в равновесие).

Коллекционирование фракций проводили вручную одновременно с выходом пика на хроматограмме. Контроль чистоты полученных соединений проводили с использованием системы аналитической ВЭЖХ (Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором при $\lambda=254$ нм). Готовые растворы высушивали методом лиофильной сушки и перерастворяли в дейтерированном диметилсульфоксиде (ДМСО-*d6*) с целью дальнейшей установления структуры полученных соединений методом ЯМР.

2.2.3.3 Установление структуры полученных соединений

Структуру выделенных соединений устанавливали на базе ресурсного центра Санкт-Петербургского государственного университета методами одномерной и двумерной ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III 400 MHz, Германия) в дейтерированном диметилсульфоксиде (ДМСО-*d6*), а также масс-спектрометрией низкого разрешения (спиртовые растворы выделенных компонентов) на хромато-масс-спектрометре Flexar-15 (Perkin Elmer, США) с масс-спектрометрическим сингл квадрупольным детектором, способ ионизации – электроспрей (ESI) в режиме сканирования SCAN в диапазоне масс 100-400, в положительной и отрицательной ионизации. Масс-спектрометрический анализ осуществляли на базе ЦКП «Аналитический центр» СПХФУ.

2.2.3.4 Прогностическая оценка фармакологической активности выделенных соединений

Прогнозирование фармакологической активности выделенных индивидуальных соединений оценивали с помощью программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) [126].

2.2.3.5 Изучение ГФ методом газовой хроматографии с масс-спектрометрией

Компонентный состав гексановой фракции (методика получения приведена в п. 2.2.3.1) определяли методом ГХ-МС на газовом хроматографе с масс-спектрометрическим детектором «Clarus 600Т» («PerkinElmer», США), колонка Elite-5MS, толщина фазы 0,25 мкм размером 30 м × 0,25 мм. Хроматографический режим: начальная температура термостата колонки – 50 °С, поддержание изотермы в течение 10 мин; повышение температуры 50 - 270 °С со скоростью 20 °С/мин, выдержка конечной температуры составляла 10 мин. Температура испарителя 250 °С. Газ-носитель – гелий со скоростью подачи 0.2 мл/мин. Объем вводимой пробы составлял 0,5 мкл. Коэффициент разделения 20:1, способ ионизации –электронный удар (EI) , масс-фильтр - сингл квадруполь низкого разрешения. Компонентный состав гексановой фракции определяли методом сравнения масс-спектров полученных в процессе хроматографирования отдельных химических веществ с объединенными данными библиотеки масс-спектров NIST 10 и внутренней библиотеки (индекс подобия – не менее 800). Обработку проводили с помощью программ AMDIS, UniChrom и ACD-SpecManager.

Количественную оценку отдельных компонентов проводили методом внутренней нормализации без оценки отклика детектора.

2.2.4. Методы статистической обработки результатов

Обработку результатов химического эксперимента осуществляли с применением методов математической статистики в соответствии с рекомендациями ГФ РФ XIV ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [92] с использованием программного обеспечения «Microsoft Excel» версия 16.60.

ГЛАВА 3. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЯ *ORTHILIA SECUNDA* L. И РАСТЕНИЙ РОДА *RHODIOLA*

3.1. Результаты фитохимического скрининга основных групп БАВ

3.1.1. Результаты предварительного фитохимического исследования с помощью групповых качественных реакций

В ходе исследования с помощью групповых качественных реакций были получены данные о химическом составе травы ортилии однобокой и корневищ и корней растений рода *Rhodiola* в сравнительном аспекте.

В траве ортилии однобокой установлено наличие углеводов, аминокислот, терпеновых соединений и соединений фенольной природы (флавоноидов, дубильных веществ). В сырье растений рода *Rhodiola* обнаружены углеводы, аминокислоты, вещества фенольной природы (флавоноиды, дубильные вещества), терпеновые соединения в т.ч. сапонины.

Результаты предварительного изучения состава групп БАВ изучаемых растений с помощью качественных реакций представлены в таблице 5.

3.1.2. Хроматографическое исследование основных групп БАВ

Индивидуальные компоненты основных групп БАВ устанавливали методами ТСХ и ВЭТСХ. Методики получения извлечений, а также условия проведения анализа представлены в пункте 2.2.2.3.

Аминокислоты. Методом ТСХ в водном и солянокислом извлечении корневищ и корней родиолы четырехлепестной и родиолы разнозубчатой идентифицировано 2 пятна оранжевого и красного цвета в видимом свете, которые окрашивались в фиолетовый после обработки реактивом А. Значения R_f данных пятен совпадали с R_f СО аргинина ($R_f=0,16$) и метионина ($R_f=0,44$) (таблица 6). Определение аминокислотного состава в сырье родиолы розовой не проводилось, ввиду наличия в научной литературе сведений о составе данной группы БАВ. Аминокислотный состав сырья ортилии однобокой был установлен в работе [11], он представлен L – аспарагином, DL-β-аланином, DL -серином, L-цистеином, DL-метионином.

Таблица 5- Результаты предварительной идентификации основных групп БАВ в сырье изучаемых растений

Группа БАВ	Качественная реакция	Ортилия однобокая		Родиола четырехлепестная		Родиола розовая		Родиола разнозубчатая	
		Эффект	Интенс.	Эффект	Интенс.	Эффект	Интенс.	Эффект	Интенс.
1	2	3		4		5		6	
Углеводы	с реактивом Фелинга	кирпично-красный осадок	+	кирпично-красный осадок	+	нет визуального эффекта		обильный кирпично-красный осадок	++
	с α -нафтолом	вишневое кольцо на границе раздела фаз	+	вишневое кольцо на границе раздела фаз	+	вишневое кольцо на границе раздела фаз	+	вишневое кольцо на границе раздела фаз	+
	с этанолом 96%	аморфный осадок	+	аморфный осадок	+++	аморфный осадок	+++	аморфный осадок	+++
Терпеновые соединения	с реактивом Штала	сине-фиолетовая окраска	++	синяя окраска	+++	синяя окраска	+++	синяя окраска	+++
	с реактивом Трим-Хилла	синяя окраска	+	синяя окраска	++	синяя окраска	++	синяя окраска	++
Флавоноиды	с железа (III) хлоридом	темно-зеленая окраска	++	зеленая окраска	+	темно-зеленая окраска	++	зеленая окраска	+
	со спиртовым раствором алюминия хлорида	грязно-желтая окраска	+++	желто-зеленая окраска	+	грязно-зеленая окраска	+	желто-зеленая окраска	+
	цианидиновая проба	Оранжево-розовая окраска (при добавлении бутанола - орг. слой - розовый)	+	Оранжево-розовая окраска (при добавлении бутанола - орг. слой - вишневый)	+	Оранжево-розовая окраска (при добавлении бутанола - орг. слой - вишневый)	+	Оранжево-розовая окраска (при добавлении бутанола - орг. слой - вишневый)	+

1	2	3		4		5		6	
	с калия гидроксидом	желтая окраска	+	желтая окраска	+	ярко-желтая окраска	++	желтая окраска	+
	со средним свинца ацетатом	желтый осадок	+	красновато-желтый осадок	++	желтый осадок	++	желтый осадок	++
Дубильные вещества	с раствором желатина 1%	помутнение	+	помутнение	++	помутнение	++	помутнение	++
	с раствором железоммонийных квасцов	черно-зеленая окраска	+	черно-синяя окраска	+	черно-синяя окраска	+	черно-синяя окраска	+
Аминокислоты	с 1% спиртовым раствором нингидрина	фиолетовая окраска	+	фиолетовая окраска	+++	фиолетовая окраска	+	фиолетовая окраска	+++
Сапонины	проба пенообразования	нет визуального эффекта		образование пены	+	нет визуального эффекта		нет визуального эффекта	
	реакция Лафона	нет визуального эффекта		нет визуального эффекта		нет визуального эффекта		нет визуального эффекта	
	реакция Сальковского	нет визуального эффекта		оранжевая окраска	+	желто-оранжевая окраска	+	оранжевая окраска	++
	с ванилином и серной кислотой (реакция Санье)	нет визуального эффекта		нет визуального эффекта		красная окраска	+	красная окраска	+
	Определения химической природы (высота пены в см)	нет визуального эффекта		кисл. 1,5 щел. 0,5		кисл. 1,0 щел. 1,0		кисл. 1,5 щел. 3,0	

Примечание: Количество «+» обозначает интенсивность эффекта реакции в диапазоне «+++»-эффект ярко выражен, «+»-эффект незначителен.

Таблица 6 - Результаты ТСХ-анализа аминокислот в корневищах и корнях родиолы четырехлепестной и родиолы разнозубчатой.

СО аминокислот	Rf	Значение Rf в извлечениях			
		р. четырехлепестной		р. разнозубчатой	
		Водное	Солянокислое	Водное	Солянокислое
Аргинин	0,16	0,16±0,01	0,16±0,01	0,17±0,01	0,17±0,01
Метионин	0,44	0,45±0,01	0,47±0,01	0,43±0,01	0,43±0,01

Примечание: «-» - аминокислота не обнаружена в извлечении

Органические кислоты. Качественный состав органических кислот в водных извлечениях устанавливали в системах 1 и 2. Хроматограммы обрабатывали реактивом Б, после чего пятна органических кислот окрашивались в оранжевый цвет. В результате эксперимента было установлено, что система 2 является более селективной, поэтому в дальнейших исследованиях система 1 не использовалась.

В результате хроматографического исследования в траве ортилии однобокой было обнаружено 4 органических кислоты - аскорбиновая, винная, яблочная и лимонная.

Компонентный состав органических кислот изучаемых видов родиол отличается, так в водных извлечениях родиолы четырехлепестной и родиолы разнозубчатой обнаружена только аскорбиновая кислота, в то время как родиола розовая более богата представителями данной группы БАВ, в ней идентифицированы лимонная, щавелевая, яблочная и янтарная кислоты (таблица 7).

Таблица 7 - Результаты ТСХ-анализа состава органических кислот в растениях – объектах исследования

Органические кислоты	Значение Rf СО	Значение Rf в водном извлечении			
		Ортилия однобокая	Родиола четырехлепестная	Родиола розовая	Родиола разнозубчатая
1	2	3	4	5	6
Аскорбиновая к-та	0,73	0,71	0,73	-	0,73
Винная к-та	0,36	0,35	-	-	-

1	2	3	4	5	6
Лимонная к-та	0,39	0,39	-	0,38	-
Щавелевая к-та	0,14	-	-	0,15	-
Яблочная к-та	0,51	0,50	-	0,51	-
Янтарная к-та	0,90	-	-	0,91	-

Примечание: «-» - органическая кислота в извлечении не идентифицирована

Флавоноиды. Идентификацию флавоноидов в спирто-водном извлечении (экстрагент спирт этиловый 70%) проводили методом ТСХ и ВЭТСХ в системах 1, 3, 8, 11. Наиболее репрезентативные результаты были получены в системе 3. Хроматограммы просматривали в УФ-свете при двух длинах волн - 254 и 366 нм (рис. 7). Оценивали такие параметры как фактор удерживания (R_f) и окраску пятен.

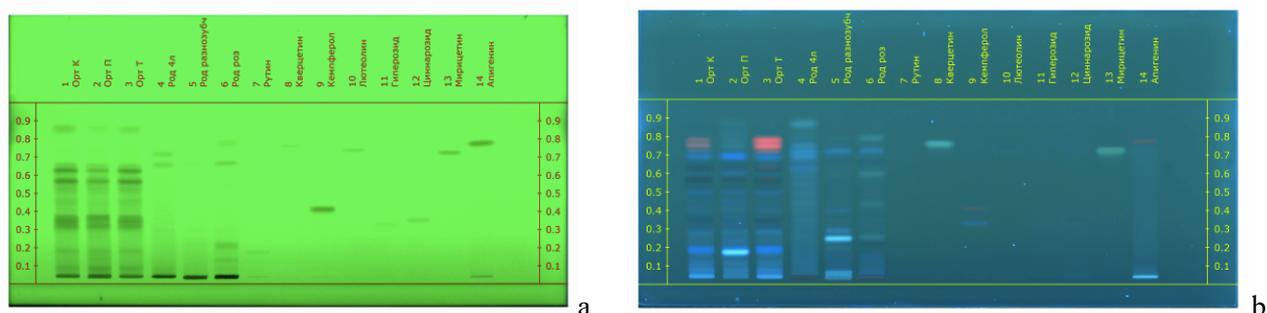


Рисунок 7 – ВЭТСХ-анализ флавоноидов (детекция а - при $\lambda = 254$ нм, б - при $\lambda = 366$ нм)

В извлечении травы ортилии однобокой, заготовленной в Казахстане, установлено наличие рутина, кемпферола, гиперозида, цинарозида и мирицетина. В сырье ортилии, заготовленной в Тюменской области и Пермском крае, идентифицированы рутин, кемпферол, гиперозид и цинарозид (таблица 8), что указывает на отличие в химическом составе растений, заготовленных в разных климатических зонах.

Растения рода родиола не отличаются многокомпонентным составом флавоноидов. Так, в родиоле четырехлепестной обнаружено 3 флавоноида: рутин, мирицетин, лютеолин. В родиоле разнозубчатой идентифицирован кверцетин, а у розовой установили наличие лютеолина (таблица 8).

Простые фенольные соединения и их гликозиды, такие как арбутин, гидрохинон и галловую кислоту идентифицировали методом ТСХ и ВЭТСХ в системе 12. Детекцию и оценку параметров пятен проводили аналогично флавоноидам в соответствии с условиями, приведенными в таблице 7. Арбутин и гидрохинон идентифицируются при просмотре в УФ-свете только при длине волны 366 нм (рис. 8 б).

В спирто-водном извлечении травы ортилии однобокой из 3 мест заготовки идентифицированы арбутин и галловая кислота. Также галловая кислота была обнаружена в извлечениях родиолы четырехлепестной и родиолы розовой (рис. 8). В родиоле розовой также установлено наличие гидрохинона (таблица 9).

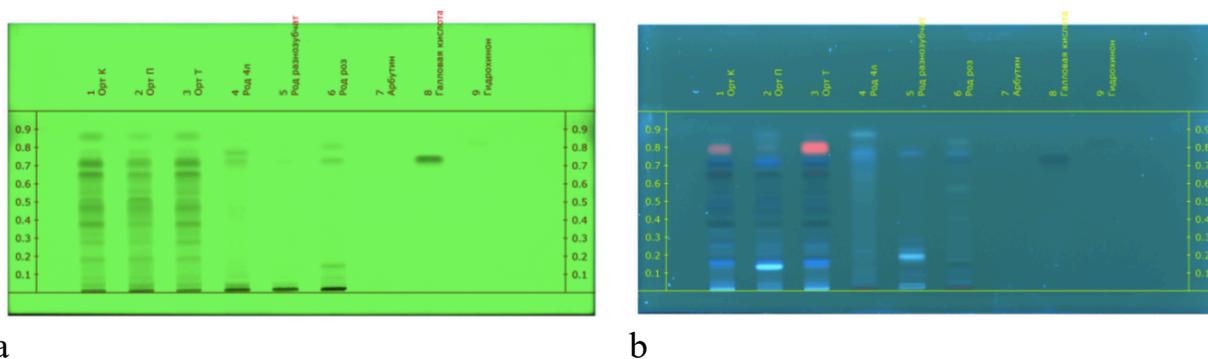


Рисунок 8 – ВЭТСХ-анализ фенольных соединений (детекция а – при $\lambda=254$ нм, б – при $\lambda=366$ нм)

Полная характеристика всех треков хроматограмм приведена в таблице 12.

Таблица 8 – Результаты изучения качественного состава флавоноидов в исследуемых растительных объектах

№ трека на хроматограмме	Исследуемый раствор/пятна	Окраска зон адсорбции		Rf
		УФ-свет (254 нм)	УФ-свет (366 нм)	
1	2	3	4	5
1	Спирто-водное извлечение ортилии однобокой (Казахстан)			
	Пятно 1	Серая	Серо-синяя	0,17
	Пятно 2	Серая	Синяя	0,33
	Пятно 3	Серая	Синяя	0,36
	Пятно 4	Темно-серая	Голубая	0,4
	Пятно 5	Серая	Синяя	0,46
	Пятно 6	Серая	Синяя	0,51
	Пятно 7	Темно-серая	Темно-синяя	0,56
	Пятно 8	Темно-серая	Синяя	0,62
	Пятно 9	Серая	Желтая	0,72
	Пятно 10	Серая	Темно-синяя	0,85
2	Спирто-водное извлечение ортилии однобокой (Пермь)			
	Пятно 1	Серая	Светло-голубая	0,16
	Пятно 2	Серая	Синяя	0,33
	Пятно 3	Темно-серая	Голубая	0,41
	Пятно 4	Серая	Синяя	0,46
	Пятно 5	Серая	Синяя	0,5
	Пятно 6	Темно-серая	Синяя	0,61
	Пятно 7	-	Голубая	0,72
3	Спирто-водное извлечение ортилии однобокой (Тюмень)			
	Пятно 1	Серая	Голубая	0,17
	Пятно 2	-	Синяя	0,33
	Пятно 3	Серая	Голубая	0,41
	Пятно 4	-	Синяя	0,46
	Пятно 5	-	Синяя	0,51
	Пятно 6	-	Синяя	0,56
	Пятно 7	-	Синяя	0,61

1	2	3	4	5
4	Спирто-водное извлечение родиолы четырехлепестной			
	Пятно 1	Серая	-	0,19
	Пятно 2	-	Голубая	0,63
	Пятно 3	-	Синяя	0,68
	Пятно 4	Серая	Светло-голубая	0,71
	Пятно 5	Серая	Темно-синяя	0,74
5	Спирто-водное извлечение родиолы разнозубчатой			
	Пятно 1	-	Светло-голубая	0,25
	Пятно 2	-	Синяя	0,30
	Пятно 3	-	Синяя	0,39
	Пятно 4	-	Темно-синяя	0,68
	Пятно 5	-	Синяя	0,71
	Пятно 6	-	Светло-желтая	0,76
6	Спирто-водное извлечение родиолы розовой			
	Пятно 1	Серая	Синяя	0,14
	Пятно 2	Темно-серая	Темно-синяя	0,25
	Пятно 3	-	Светло-желтая	0,27
	Пятно 4	-	Светло-желтая	0,43
	Пятно 5	-	Светло-желтая	0,61
	Пятно 6	Серая	Темно-синяя	0,66
	Пятно 7	Серая	Синяя	0,73
Пятно 8	-	Светло-желтая	0,80	
7	Рутин	Серая	Темно-серая	0,17
8	Кверцетин	-	Желтая	0,76
9	Кемпферол	Темно-серая	Голубая	0,41
10	Лютеолин	Серая	Темно-синяя	0,74
11	Гиперозид	-	Синяя	0,32
12	Циннарозид	Серая	Синяя	0,35
13	Мирицетин	Серая	Желтая	0,72
14	Апигенин	Серая	Темно-синяя	0,78

Таблица 9- Результаты ВЭТСХ – анализа объектов исследования на наличие арбутина, гидрохинона и ГК

№ трека на хроматограмме	Исследуемый раствор/пятна	Окраска зон адсорбции		Rf
		УФ-свет (254 нм)	УФ-свет (366 нм)	
1	2	3	4	5
1	Спирто-водное извлечение ортилии однобокой (Казахстан)			
	Пятно 1	Светло-серая	Синяя	0,20
	Пятно 2	Серая	Синяя	0,27
	Пятно 3	Серая	Темно-синяя	0,35
	Пятно 4	Серая	Синяя	0,45
	Пятно 5	Серая	Синяя	0,5
	Пятно 6	Серая	Синяя	0,55
	Пятно 7	Темно-серая	Синяя	0,68
	Пятно 8	Серая	Синяя	0,74
	Пятно 9	-	Розовая	0,8
	Пятно 10	-	Желтая	0,88
2	Спирто-водное извлечение ортилии однобокой (Пермь)			
	Пятно 1	Светло-серая	Синяя	0,2
	Пятно 2	Серая	Синяя	0,27
	Пятно 3	Серая	Темно-синяя	0,35
	Пятно 4	Серая	Синяя	0,45
	Пятно 5	Серая	Синяя	0,51
	Пятно 6	Серая	Синяя	0,55
	Пятно 7	Темно-серая	Синяя	0,68
	Пятно 8	Темно-серая	Синяя	0,73
	Пятно 9	-	Желтая	0,8
	Пятно 10	-	Желтая	0,88
3	Спирто-водное извлечение ортилии однобокой (Тюмень)			
	Пятно 1	Светло-серая	Синяя	0,2
	2	3	4	5
	Пятно 2	Серая	Синяя	0,27
	Пятно 3	Серая	Темно-синяя	0,35

1	2	3	4	5
	Пятно 4	Серая	Синяя	0,45
	Пятно 5	Серая	Синяя	0,51
	Пятно 6	Серая	Синяя	0,55
	Пятно 7	Темно-серая	Синяя	0,68
	Пятно 8	Серая	Синяя	0,73
	Пятно 9	-	Розовая	0,8
	Пятно 10	-	Желтая	0,88
4	Спирто-водное извлечение родиолы четырехлепестной			
	Пятно 1	Серая	Синяя	0,72
	Пятно 2	Серая	Голубая	0,78
	Пятно 3	-	Голубая	0,87
5	Спирто-водное извлечение родиолы разнозубчатой			
	Пятно 1	-	Ярко-голубая	0,23
	Пятно 2	-	Синяя	0,26
	Пятно 3	-	Синяя	0,30
	Пятно 4	-	-	0,74
	Пятно 5	-	Голубая	0,79
6	Спирто-водное извлечение родиолы розовой			
	Пятно 1	Серая	Синяя	0,15
	Пятно 2	-	Светло-желтая	0,59
	Пятно 3	Серая	Синяя	0,73
	Пятно 4	-	Голубая	0,78
	Пятно 5	Серая	Светло-синяя	0,83
7	Арбутин	-	Желтый	0,89
8	Галловая кислота	Серая	Синяя	0,73
9	Гидрохинон	Серая	Синяя	0,81

ГКК. Для ТСХ использовали спирто-водные извлечения в системах 1, 5, 9, 10. Было установлено, что система 5 обладает оптимальной разделяющей способностью, поэтому идентификацию методом ВЭТСХ проводили в этой системе. Хроматограммы просматривали в фильтрованном УФ-свете при 2 длинах волн до и после обработки парами аммиака.

В результате в извлечении травы ортилии однобокой, заготовленной в Пермском крае, установлено наличие синаповой, п-кумаровой и кофейной кислот. В ортилии, заготовленной в Тюменской области и в Казахстане, ГКК идентифицированы не были, следовательно, можно предположить, что тезис о разнообразии химического состава ортилии однобокой в зависимости от региона произрастания является верным.

В извлечении родиолы четырехлепестной методом ВЭТСХ было обнаружены синаповая, розмариновая и кофейная кислоты. В родиоле разнозубчатой и родиоле розовой установлены хлорогеновая и синаповая кислоты. Результаты ВЭТСХ-анализа ГКК представлены в таблице 10.

ФКК. Условия проведения ТСХ-анализа ФКК в объектах исследования приведены в таблице 6. При помощи метода ТСХ было установлено, что система 5 наиболее пригодна для разделения и идентификации ФКК, поэтому в дальнейшем она была выбрана для анализа данной группы БАВ. В ходе исследования было установлено, что спирто-водное извлечение травы ортилии однобокой заготовленной в Пермском крае содержит сиреневую и протокатеховую кислоты, в то время как извлечение ортилии однобокой из Казахстана и Тюмени содержит только сиреневую кислоту, что указывает на влияние эколого-фитоценологических условий произрастания на фитохимический профиль.

В спирто-водном извлечении из корневищ и корней растений рода *Rhodiola* ФКК (в сравнении с имеющимися СО ФКК) идентифицированы не были.

Результаты совместного исследования ГКК и ФКК методом ВЭТСХ представлены на рисунке 9 и в таблице 10.

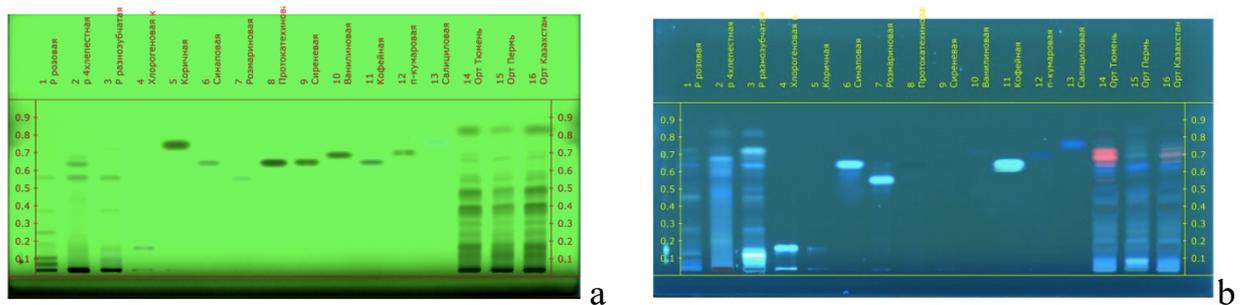


Рисунок 9 -Результаты ВЭТСХ-анализа ГKK и ФKK (детекция а – при $\lambda= 254$ нм, b – при $\lambda= 366$ нм)

Таблица 10 – Результаты ВЭТСХ-анализа ГKK и ФKK

№ трека на хроматограмме	Исследуемый раствор/пятна	Окраска зон адсорбции		Rf
		УФ-свет (254 нм)	УФ-свет (366 нм)	
1	2	3	4	5
1	Спирто-водное извлечение родиолы розовой			
	Пятно 1	Серая	Голубая	0,17
	Пятно 2	-	Голубая	0,45
	Пятно 3	-	Светло-желтая	0,63
	Пятно 4	-	Серая	0,7
2	Спирто-водное извлечение родиолы четырехлепестной			
	Пятно 1	-	Синяя	0,14
	Пятно 2	Серая	Голубая	0,55
	Пятно 3	Серая	Голубая	0,62
	Пятно 4	Серая	Голубая	0,63
3	Спирто-водное извлечение родиолы разнозубчатой			
	Пятно 1	Серая	Синяя	0,15
	Пятно 2	-	Синяя	0,55
	Пятно 3	Серая	Голубая	0,64
	Пятно 4	-	Голубая	0,68
	Пятно 5	-	Светло-зеленая	0,72
4	Хлорогеновая кислота	Серая	Голубая	0,16
	Коричная кислота	Темно-серая	-	0,74
	Синаповая кислота	Серая	Голубая	0,64
	Розмариновая кислота	Серая	Голубая	0,55
	Протокатеховая кислота	Темно-серая	Темно-синяя	0,63
	Сиреневая кислота	Серая	Синяя	0,66

1	2	3	4	5
10	Ванилиновая кислота	Темно-серая	Синяя	0,68
11	Кофейная кислота	Серая	Голубая	0,63
12	п-Кумаровая кислота	Серая	Темно-синяя	0,70
13	Салициловая кислота			
14	Спирто-водное извлечение ортилии однобокой (Тюмень)			
	Пятно 1	Темно-серая	Темно-синяя	0,18
	Пятно 2	Серая	Синяя	0,25
	Пятно 3	Темно-серая	Синяя	0,31
	Пятно 4	Темно-серая	Темно-синяя	0,35
	Пятно 5	Темно-серая	Темно-синяя	0,41
	Пятно 6	Серая	Синяя	0,56
	Пятно 7	Серая	Розовая	0,59
	Пятно 8	Серая	Синяя	0,65
	Пятно 9	Серая	Розовая	0,68
	Пятно 10	Серая	Ярко-розовая	0,71
	Пятно 11	Темно-серая	Темно-синяя	0,83
15	Спирто-водное извлечение ортилии однобокой (Пермь)			
	Пятно 1	Темно-серая	Темно-синяя	0,18
	Пятно 2	Серая	Темно-синяя	0,24
	Пятно 3	Темно-серая	Синяя	0,32
	Пятно 4	Темно-серая	Темно-синяя	0,35
	Пятно 5	Темно-серая	Темно-синяя	0,41
	Пятно 6	Серая	Синяя	0,56
	Пятно 7	Серая	Темно-синяя	0,61
	Пятно 8	Серая	Синяя	0,64
	Пятно 9	Серая	Темно-синяя	0,68
	Пятно 10	Серая	Серая	0,70
	Пятно 11	Темно-серая	Темно-синяя	0,83
16	Спирто-водное извлечение ортилии однобокой (Казахстан)			
	Пятно 1	Темно-серая	Темно-синяя	0,18
	Пятно 2	Серая	Темно-синяя	0,25
	Пятно 3	Темно-серая	Синяя	0,31
	Пятно 4	Темно-серая	Темно-синяя	0,35
	Пятно 5	Темно-серая	Темно-синяя	0,41
	Пятно 6	Серая	Синяя	0,56
	Пятно 7	Серая	Темно-синяя	0,59
	Пятно 8	Серая	Синяя	0,65
	Пятно 9	Серая	Розовая	0,67
	Пятно 10	Серая	Ярко-розовая	0,71
	Пятно 11	Темно-серая	Темно-синяя	0,83

Родоспецифичные фенольные спирты и их гликозиды определяли в метанольных извлечениях из сырья растений рода *Rhodiola*. методом ВЭТСХ в системе 6. Идентификацию салидрозида и тирозола проводили в УФ-свете при двух длинах волн, наличие розарина определяли после обработки хроматограммы **реактивом Д**.

Результаты хроматографического исследования 3 видов родиол представлены на рисунке 10 и в таблице 11.

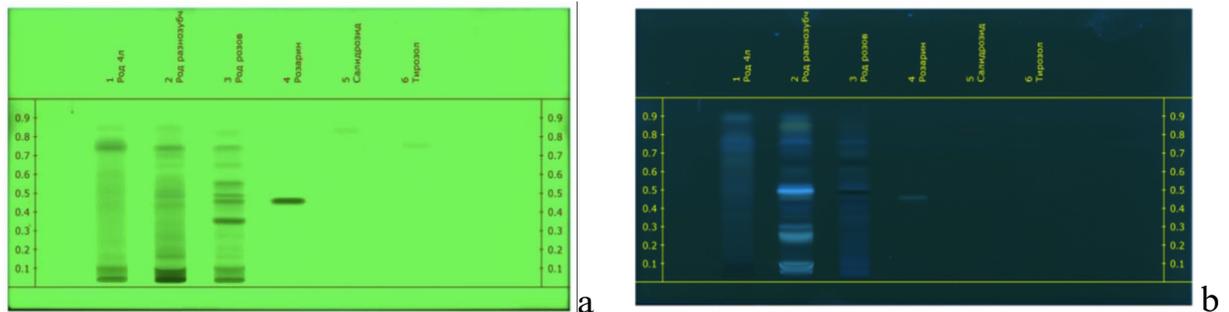


Рисунок 10 -Результаты ВЭТСХ-анализа фенольных спиртов и их гликозидов 3 видов родиол при $\lambda = 254$ нм (а) и 366 нм(б)

Таблица 11 – Результаты ВЭТСХ-анализа фенольных спиртов и их гликозидов 3 видов родиол

№ трека на хроматограмме	Исследуемый раствор/пятна	Окраска в УФ-свете $\lambda = 254$ нм	УФ-свет $\lambda = 366$ нм	Окраска зон адсорбции реактивом Д	Rf
1	2	3	4	5	6
1	Метанольное извлечение родиолы четырехлепестной				
	Пятно 1	серая	-	-	0,15
	Пятно 2	темно-серая	синяя	-	0,75
	Пятно 3	серая	-	-	0,84
2	Метанольное извлечение родиолы разнозубчатой				
	Пятно 1	темно-серая	-	-	0,14
	Пятно 2	-	синяя	серая	0,27
	Пятно 3	-	серо-голубая	серая	0,31
	Пятно 4	серая	темно-синяя	-	0,45
	Пятно 5	серая	ветло-голубая	серая	0,50
	Пятно 6	серая	синяя	-	0,75
	Пятно 7	серая	-	-	0,84
Пятно 8	-	желтая	-	0,87	
3	Метанольное извлечение родиолы розовой				
	Пятно 1	светло-серая	-	-	0,15
	Пятно 2	темно-серая	-	серая	0,38
	Пятно 3	темно-серая	светло-серая	серая	0,47
	Пятно 4	темно-серая	темно-синяя	-	0,51
	Пятно 5	темно-серая	-	-	0,57
	Пятно 6	серая	темно-синяя	серая	0,66
Пятно 7	серая	синяя	-	0,74	

1	2	3	4	5	6
	Пятно 8	серая	-	-	0,83
4	Розарин	темно-серая	светло-серая	серая	0,48
5	Салидрозид	серая	-	-	0,84
6	Тирозол	серая	-	-	0,76

Терпеновые соединения. Идентификацию терпеновых соединений методом ТСХ проводили в спиртовом извлечении в системах 4 и 7. Детектировали вещества реактивами В, Г. Система 7 оказалась неэффективной, поэтому в дальнейших исследованиях не использовалась. Идентификацию соединений терпеновой природы, по причине отсутствия СО, проводили по характерному окрашиванию пятен веществ под воздействием хромогенных специфических реактивов и литературным значениям коэффициентов подвижность (R_f) этого класса в идентичных хроматографических условиях. В результате анализа было установлено наличие 7 веществ в извлечении родиолы четырехлепестной, которые после окрашивания реактивом В приобретали фиолетовую окраску ($R_f=0,22; 0,24; 0,25; 0,38; 0,56; 0,61; 0,72$). В извлечении родиолы разнозубчатой было установлено 5 соединений с аналогичным окрашиванием под действием реактива В ($R_f=0,2; 0,22; 0,24; 0,64; 0,78$). В извлечении родиолы розовой обнаружили 2 пятна фиолетового окрашивания после обработки реактивом В.

В спиртовом извлечении ортилии однобокой (из 3 фитоценологических зон) было обнаружено 1 пятно фиолетового цвета после обработки хроматограммы реактивом В ($R_f=0,54$). Можно предположить, что данное вещество относится к группе иридоидов.

3.1.3. Компонентный состав гексановой фракции корневищ и корней родиолы четырехлепестной

Методика получения ГФ изложена в главе 2 пункт 2.2.3.4.

В результате ГХ-МС анализа гексановой фракции корневищ и корней родиолы четырехлепестной было установлено наличие 22 компонентов, 17 из

которых были идентифицированы (таблица 12). Хроматограмма ГФ приведена на рисунке 11.

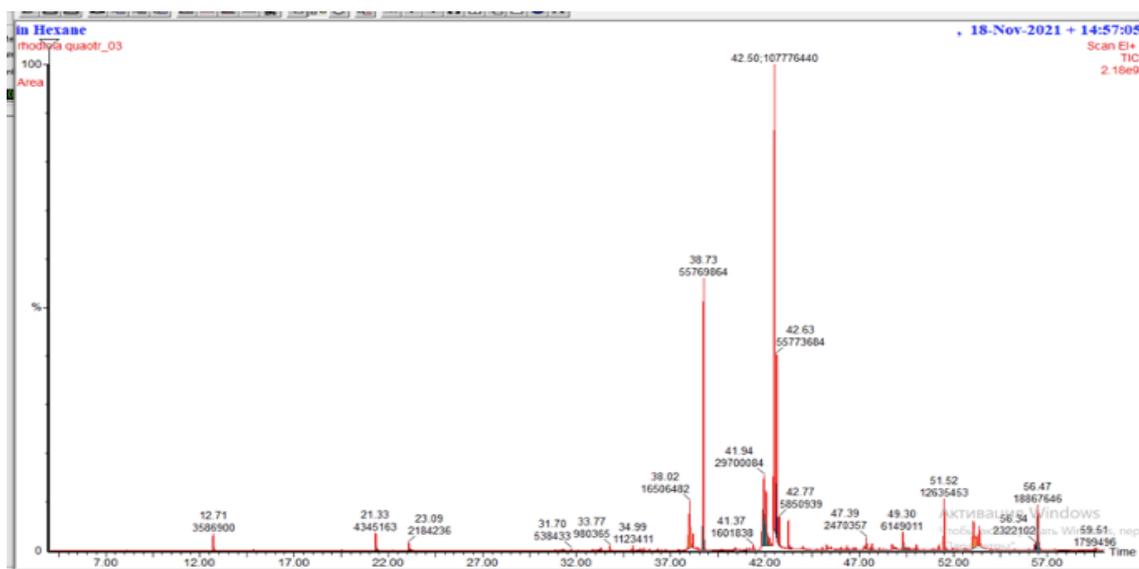


Рисунок 11– Хроматограмма гексановой фракции р. четырехлепестной

Таблица 12-Компонентный состав гексановой фракции родиолы четырехлепестной

№	Компонент ГФ	Время удерживания, t_R	Содержание в образце, $(x_{cp} \pm \Delta x) \%^3$
1	2	3	4
1	Бензиловый спирт	12,71	1,08±0,01
2	2-(4-метоксифенил)этанол	21,33	1,32±0,01
3	Гексадекановая кислота	38,02	5,00±0,03
4	Этиловый эфир пальмитиновой кислоты	38,73	16,90±0,23
5	Линолевая кислота	41,94	9,00±0,02
6	Этиловый эфир линолевой кислоты	42,50	32,67±0,51
7	Этиловый эфир олеиновой кислоты	42,63	16,90±0,21
8	4,8,12,16-тетраметилгептадекан-4-олид	46,35	0,10±0,01
9	Олеиновая кислота	46,83	0,11±0,01
10	Этиловый эфир эйкозановой кислоты	47,39	0,75±0,03
11	10-генийкозен	47,68	0,16±0,01

³ % содержание компонентов является приблизительным, так рассчитано методом внутренней нормализации без оценки отклика детектора; **выделены** мажоритарные компоненты ГФ.

1	2	3	4
12	Пентадеканаль	48,08	0,16±0,01
13	6,9-пентадекалиен-1-ол	48,76	0,13±0,01
14	Эйкозанол	49,3	1,86±0,10
15	Эйкозил ацетат	51,52	3,83±0,09
16	Бутил 9,12-октадекадиеноат	53,06	1,41±0,02
17	1-Докозанол ацетат	56,47	5,72±0,01

Как видно из данных таблицы 12 основные компоненты ГФ – сложные эфиры жирных кислот. Они занимают в общей сложности более 50% идентифицированных соединений. К мажоритарным относятся этиловые эфиры линолевой кислоты, олеиновой кислоты и пальмитиновой кислоты. В то же время необходимо отметить, что в ГФ корневищ с корнями родиолы четырехлепестной отсутствуют терпены, характерные для эфирного масла родиолы розовой (в частности, гераниол), что с одной стороны говорит о разном фитохимическом профиле растений одного рода, а с другой обуславливает отсутствие характерного запаха у сырья родиолы четырехлепестной.

3.1.4. Количественное определение основных групп БАВ

3.1.4.1. Количественное определение родоспецифичных фенольных соединений и их гликозидов в 3 видах растений рода *Rhodiola*

Количественное определение родоспецифичных фенольных соединений и их гликозидов в сырье родиолы четырехлепестной (приобретенного в аптечных учреждениях и заготовленной самостоятельно), родиолы разнозубчатой и родиолы розовой проводили методом ВЭЖХ в соответствии с методикой, указанными в пункте 2.2.2.4 (С).

Результаты ВЭЖХ-анализа (рисунок 14) демонстрируют различие в профиле родоспецифичных фенилпропаноидов различных видов рода родиола. Так, производные коричных спиртов и их гликозиды – розарин, розавин, розиридол и др – характерны только для сырья родиолы розовой. В то время как для корневищ с корнями двух других видов родиол - четырехлепестной и разнозубчатой – характерно наличие только фенольных

спиртов и гликозидов (салидрозида и тирозола), которые также присутствуют в родиоле розовой. Но все 3 вида отличает количественное содержание целевых компонентов (таблица 14). В сырье родиолы четырехлепестной, заготовленной в естественной среде обитания самостоятельно, установлено содержание салидрозида (таблица 13) в количестве 0,53%, в то время как сырье, приобретенное в аптеке содержало всего 0,16% данного соединения (рис. 12-13). Для родиолы разнозубчатой данный показатель составил 0,24%. Содержание салидрозида в родиоле розовой составило 0,059%, что значительно ниже норм, указанных в ГФ РФ XIV ФС (не менее 0,8%) [77]. По данным исследования установлено, что тирозол превалирует в родиоле разнозубчатой (0,44 %).

На основе полученных результатов, можно предположить, что все 3 изучаемых вида родиол имеют отличительные особенности в хроматографическом профиле фенилпропаноидов и их количественном содержании.

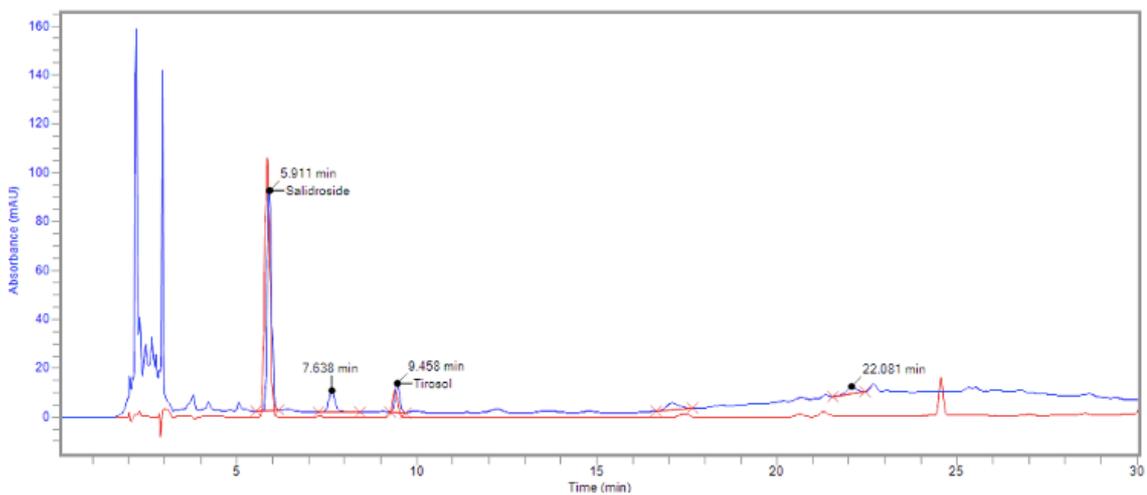


Рисунок 12 - Результаты ВЭЖХ-анализа фенольных спиртов и их гликозидов в корневищах с корнями родиолы четырехлепестной, приобретенной в аптеке (красный цвет - смесь растворов СО, синий - испытуемый раствор)

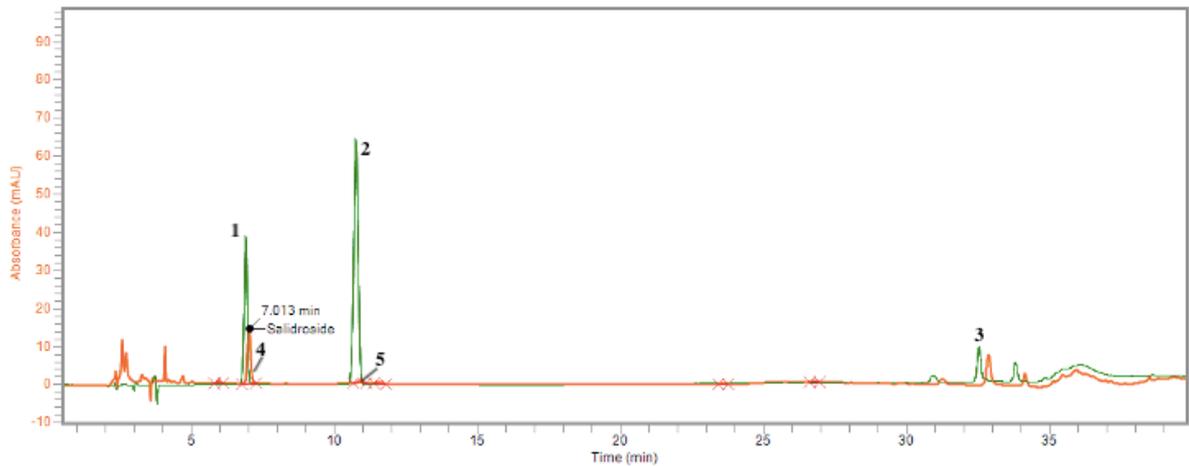


Рисунок 13 - Результаты ВЭЖХ-анализа фенольных спиртов и их гликозидов в корневищах с корнями родиолы четырехлепестной, заготовленной самостоятельно (зеленый цвет - смесь растворов СО, красный - испытуемый раствор)

Таблица 13 - Параметры хроматографического профиля фенольных спиртов и их гликозидов в корневищах с корнями родиолы четырехлепестной: 1 - заготовка Алтай; 2 - БАД

Родоспецифичные соединения	Объект исследования	Номер пика на хроматограмме	1		2	
			Время удерживания, мин (R_t)	Площадь пика (S)	Время удерживания, мин (R_t)	Площадь пика (S)
Салидрозид	Раствор СО	1	6,90	1048938	5,86	1048938
	Спиртовое извлечение <i>R. quadrifida</i>	4	7,01	122376	5,90	708493
Тирозол	Раствор СО	2	10,95	127331	9,4	127331
	Спиртовое извлечение <i>R. quadrifida</i>	5	10,90	11938	9,46	118462
Розарин	Раствор СО	3	24,56	129689	24,56	129689
	Спиртовое извлечение <i>R. quadrifida</i>	-	Не идентифицирован		Не идентифицирован	

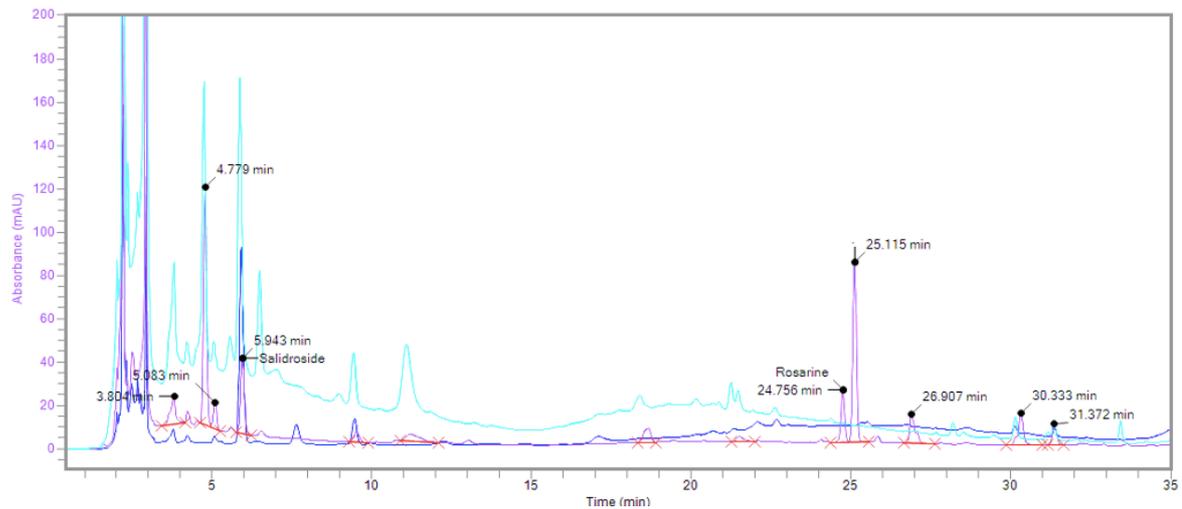


Рисунок 14 – ВЭЖХ профиль 3 видов родиол (испытуемый раствор р. розовой - фиолетовый, р. четырехлепестной - синий, р. разнозубчатой - голубой)

Таблица 14 - Содержание фенольных спиртов и их гликозидов в 3 видах родиол

Раствор стандартного образца	70% спиртовые извлечения корневищ с корнями							
	Р. розовая		Р. четырехлепестная (БАД)		Р. четырехлепестная (O)		Р. разнозубчатая	
	$X_{cp} \pm \Delta x_i, \%$	$\varepsilon, \%$	$X_{cp} \pm \Delta x_i, \%$	$\varepsilon, \%$	$X_{cp} \pm \Delta x_i, \%$	$\varepsilon, \%$	$X_{cp} \pm \Delta x_i, \%$	$\varepsilon, \%$
Тирозол	0,092 \pm 0,001	2,94	0,210 \pm 0,016	1,22	0,021 \pm 0,018	0,43	0,440 \pm 0,010	0,54
Салидрозид	0,059 \pm 0,003	0,31	0,162 \pm 0,020	0,61	0,532 \pm 0,034	0,85	0,236 \pm 0,001	0,14
Розарин	0,745 \pm 0,395	6,76	Не идентифицирован					

В ходе исследования установлено, что хроматографический профиль растений рода *Rhodiola* имеет отличия в качественном и количественном составе, что может быть использовано для стандартизации ЛРС. Содержание салидрозида и тирозола в родиоле четырехлепестной превышает аналогичный показатель в фармакопейном сырье (0,532% и 0,21% против 0,059% и 0,092% соответственно). Количественное содержание данных фенольных соединений выбрано в качестве критерия стандартизации корневищ с корнями родиолы

четырёхлепестной и установлены критерии приемлемости – не менее 0,2 % для тирозола и 0,5% для салидрозида.

3.1.4.2. Количественное определение арбутина в траве ортилии однобокой

Содержание арбутина устанавливали методом ВЭЖХ в свежеприготовленном водном извлечении из травы ортилии однобокой, заготовленной в разных эколого-фитоценоотических зонах, по методике указанной в 2.2.2.4 (D).

В результате (рис. 15 - 17, таблица 15) исследования установлено, что в траве ортилии однобокой, заготовленной на территории Казахстана и Тюменской области, содержание арбутина незначительно, в то время как в сырье пермского происхождения арбутин не идентифицирован. Однако, на хроматограммах ортилии казахского и пермского происхождения присутствуют значительные пики веществ (29 и 22 минуты соответственно), которые предположительно могут соответствовать метиларбутину, что можно заключить из того факта, что сырье этих регионов заготовки имело много почерневших и побуревших частей, что характерно при образовании метилированных производных гидрохинона.

Во всех пробах не установлено наличие гидрохинона (агликон арбутина). Следовательно, утверждать, что незначительные количества арбутина являются следствием его гидролитического расщепления нецелесообразно. Можно предположить, что пики веществ, лежащие в диапазоне 37,5–50,0 минут (время выхода СО гидрохинона – 46,2 мин) относятся к различным производным гидрохинона. Необходимо отметить, что спектры данных соединений (рис. 17) визуально схожи и имеют близкие, но различные максимумы, что дает возможность позиционировать их как соединения с близкородственной структурой.

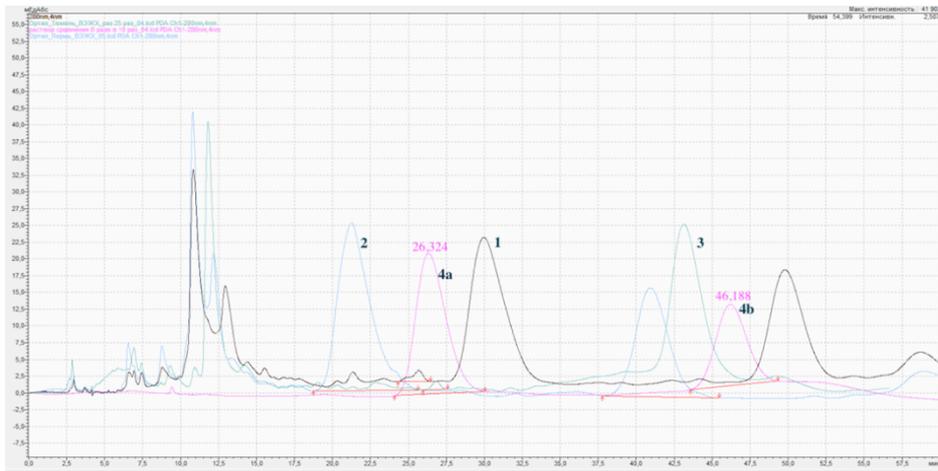


Рисунок 15- Хроматограмма извлечений из травы ортилии однобокой, заготовки: 1 - Казахстан, 2 - Пермский край, 3 - Тюменская область, 4 - раствор СО (а-арбутин, б-гидрохинон)

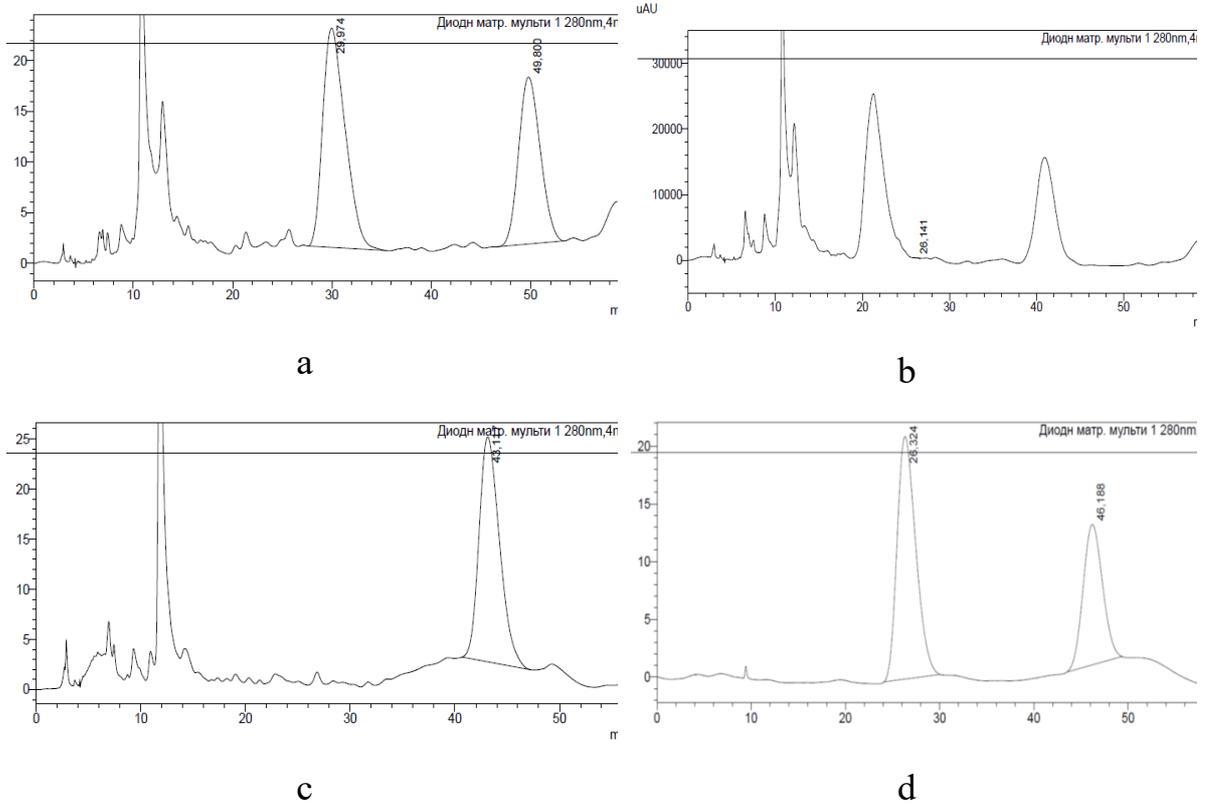


Рисунок 16 - Хроматограммы испытуемых растворов травы ортилии заготовленной в различных регионах (а –Казахстан, б - Пермь, с - Тюмень) и стандартного раствора В (d)

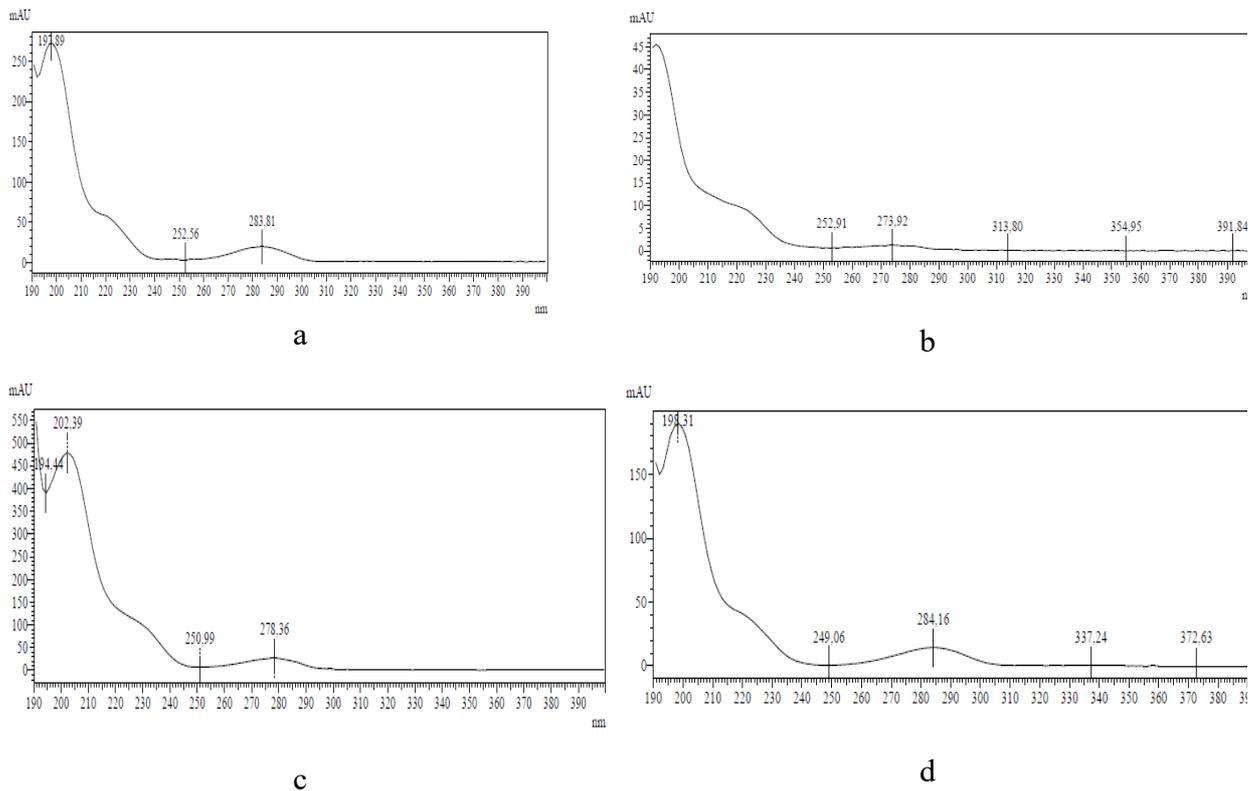


Рисунок 17 - УФ-спектры отдельных пиков на хроматограммах испытуемых растворов травы ортилии, заготовленной (а –Казахстан (пик с t_{R} 49,80), b – Пермь (пик с t_{R} 40,93), с – Тюмень (пик с t_{R} 43,12) и пика гидрохинона в стандартном растворе (d)

Результаты хроматографического исследования травы ортилии однобокой представлены в таблице 15.

Таблица 15- Результаты ВЭЖХ-анализа травы ортилии однобокой

Трава ортилии однобокой заготовленной в регионе	Время удерживания пика арбутина	Площадь пика арбутина	Содержание арбутина, % (n = 3, P=0,95)
Казахстан	25,67	89786	0,021±0,001
Пермский край	не идентифицирован		
Тюменская область	26,84	47460	0,011±0,001

Площадь пика арбутина на хроматограмме СО - 2900921.
Время удерживания арбутина на хроматограмме раствора сравнения – 26,32.

Результаты ВЭЖХ-анализа травы ортилии однобокой показали, что арбутин не является мажоритарным соединением, а следовательно, не может

быть использован в качестве маркерного компонента для установления подлинности травы ортилии однобокой. Также в ходе исследования установлены различия в компонентном составе сырья, заготовленного в разных местах обитания растения. Следовательно, можно подтвердить тезис о зависимости химического состава ортилии однобокой от климатических условий произрастания.

3.1.4.3. Количественное определение полифенольных соединений и галловой кислоты в траве ортилии однобокой методом УФ-спектрофотометрии

Галловая кислота. Количественное определение ГК в траве ортилии однобокой проводили по методике указанной в пункте 2.2.2.4 (А).

В рамках верификационной оценки для характеристики параметра «Специфичность» аналитической методики был снят спектр боратного буфера для установления отсутствия интерференционного влияния растворителя (рис. 18).

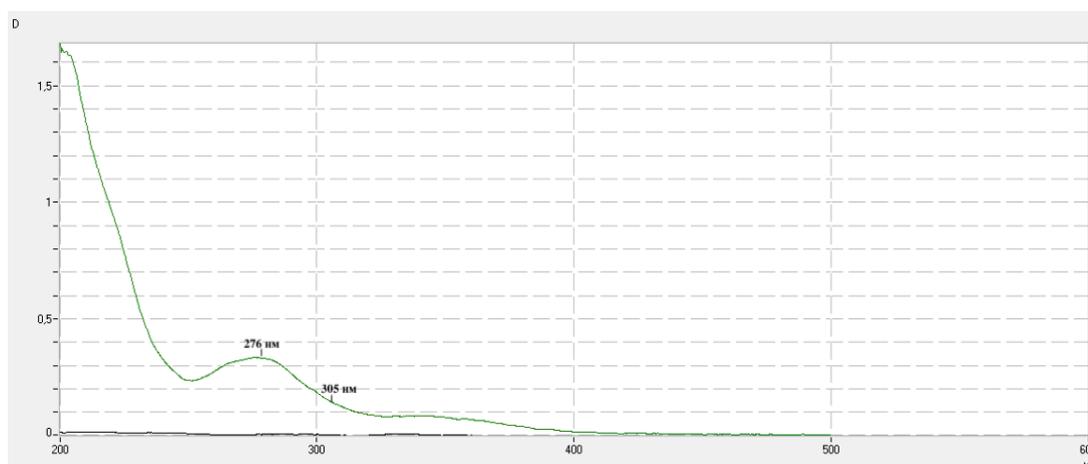


Рисунок 18 - УФ- спектр водного извлечения травы ортилии однобокой (зеленый) относительно спектра боратного буфера рН=9,0 (черный)

Спектр водного извлечения из травы ортилии однобокой имеет максимум поглощения при 276 нм, что характерно для ГК, боратный буфер не имеет поглощения в данной области, то есть не влияет на точность метода. Результаты количественного определения ГК представлены в таблице 22.

Сумма полифенольных соединений. Сумму ПФС в пересчете на ГК определяли по методике указанной в пункте 2.2.2.4 (В).

Для оценки параметра «Специфичность» снимали спектр спирта 40% (рис. 19).

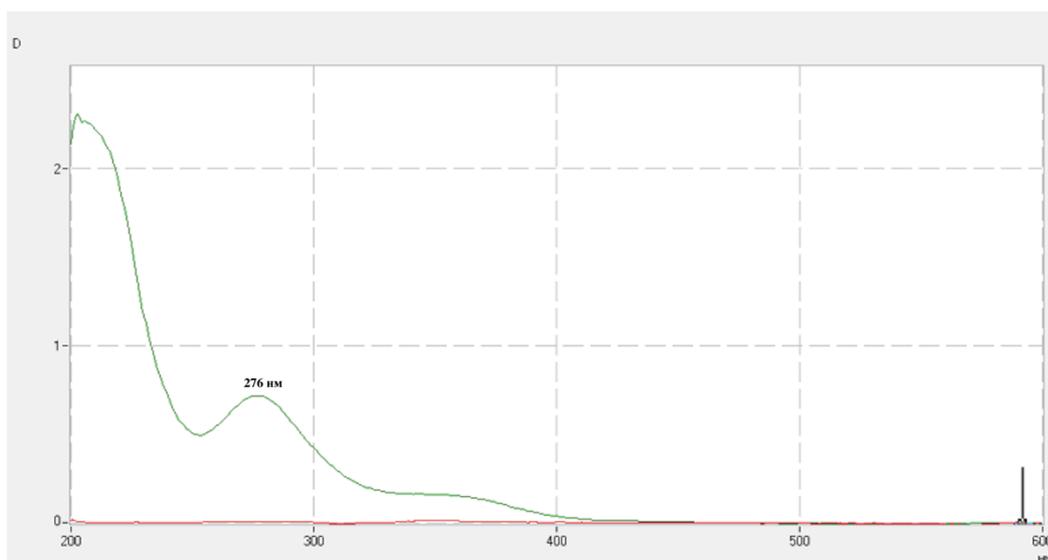


Рисунок 19 - УФ- спектр 40% спиртового извлечения травы ортилии однобокой (зеленый) относительно спектра спирта 40% (красный)

Из рис. 19 следует, что спирт 40% не имеет поглощения в данной области и не оказывает влияния на результат количественного определения ПФС. Так же как и в случае с ГК, максимум поглощения ПФС лежит в области 275 ± 2 нм, то есть данная методика может быть использована для количественного определения ПФС и является специфичной. Результаты исследования представлены в таблице 16.

Таблица 16 - Количественное содержание ГК и суммы ПФС в пересчете на ГК в траве ортилии однобокой

Целевое соединение / группа БАВ	$x_{\text{ср}} \pm \Delta x, \% (n=6)$
Галловая кислота	$6,64 \pm 0,15\%$
Сумма полифенольных соединений	$7,01 \pm 0,20\%$

В ходе исследования обнаружено значительное превалирование ГК в сумме полифенольных соединений ($6,64\%$ в общем количестве ПФ $7,01\%$, соответственно), следовательно, данное соединение может быть выбрано в качестве целевого при стандартизации ЛРС ортилии однобокой.

3.1.4.4. Количественное определение суммы ГКК в пересчете на хлорогеновую кислоту методом УФ-спектрофотометрии

С целью оценки возможности применения спектрофотометрии для количественного анализа родиолы разнозубчатой было проведено

спектрофотометрическое определение суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту, поскольку её содержание в сырье данного вида значительно и превалирует над прочими гидроксикоричными кислотами исходя из интенсивности окраски пятна на хроматограмме, полученной при ВЭТСХ-анализе. Количественное определение суммы ГКК (таблица 17) устанавливали по методике указанной в пункте 2.2.2.4 (Е).

Таблица 17— Результаты определения суммы гидроксикоричных кислот в сырье родиолы разнозубчатой методом СФМ

№	Результаты исследования, %	$X_{\text{ср}}$, %	Доверительный интервал, $n=3$	ε , %
Пересчёт суммы ГКК на хлорогеновую кислоту				
110719	1,46	1,51	$1,51 \pm 0,04$	2,8
160619	1,55			
200919	1,49			
170819	1,52			
010819	1,51			

Результаты, приведенные в таблице 17, подтверждают, что содержание ГКК в сырье родиолы четырехлепестной значительное. Однако говорить о том, что вся сумма группы БАВ приходится на хлорогеновую кислоту не совсем корректно ввиду того, что в сырье родиолы также присутствуют другие компоненты этого класса.

3.1.5. Изучение минерального состава исследуемых видов сырья

Для более полного представления о химическом составе изучаемых видов растений была поставлена задача установить минеральный профиль исследуемых объектов. Изучение макро- и микроэлементного состава проводили методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой. Методика пробоподготовки и параметры прибора представлены в пункте 2.2.4.

Результаты АЭС-ИП анализа 3 видов родиол отражены в таблице 18 и на рисунках 20-21.

Таблица 18 - Минеральный профиль 3 видов растений рода *Rhodiola*

Группа	Элемент	Суточная потребность, мг/день [127,128]	Содержание элементов, мг/кг*		
			(n=6, P=95%)		
			Р. розовая, $\bar{x}_{cp} \pm \Delta x_i$ RSD (%)	Р. четырех- лепестная, $\bar{x}_{cp} \pm \Delta x_i$ RSD (%)	Р. разно- зубчатая, $\bar{x}_{cp} \pm \Delta x_i$ RSD (%)
Макроэлементы	Na	500	66,5 ± 2,0 0,47	105,3 ± 11,0*** 1,41	78,6 ± 3,0 0,38
	Ca	1000	3666,0 ± 630,0 2,65	5518,0 ± 89,0* 0,10	6345,0 ± 195,0 0,33
	Mg	400	711,0 ± 75,0 1,71	787,0 ± 148,0 1,68	959,0 ± 11,0 0,20
	K	2500	4416,0 ± 147,0 0,44	3177,0 ± 679,0** 6,06	8131,0 ± 519,0 0,99
Микроэлементы	Al	40	253,0 ± 81,0 8,56	864,0 ± 58,0* ** 0,69	446,0 ± 21,0 0,7
	Fe	18	164,0 ± 45,0 7,97	628,0 ± 62,0* ** 0,70	299,0 ± 28,0 1,23
	Ba	Не установлена	45,9 ± 3,70 1,15	18,70 ± 1,0* ** 0,29	24,8 ± 0,2 0,08
	Cu	1,00	2,4 ± 0,50 2,41	3,8 ± 0,90 1,92	2,7 ± 0,1 0,6
	Mn	2,00	17,7 ± 3,7 3,50	52,0 ± 7,0* ** 1,08	10,6 ± 0,6 0,76

Rb	1,00-2,00	6,6 ± 0,5	2,8 ± 0,6*	3,3 ± 0,3
		1,07	3,02	0,96
Sr	0,80–3,00	21,6 ± 4,0	23,5 ± 1,3	21,0 ± 0,5
		2,02	0,69	0,30
Zn	12,00	6,3 ± 1,3	7,3 ± 0,9**	13,2 ± 0,3
		2,15	1,01	0,28

Примечание: n - количество вариантов в выборке, $\bar{x} \pm \Delta x_i$ - среднее значение выборки с доверительным интервалом, RSD - относительное стандартное отклонение, %.

*- различия с р. розовой; ** - различия с р. разнозубчатой

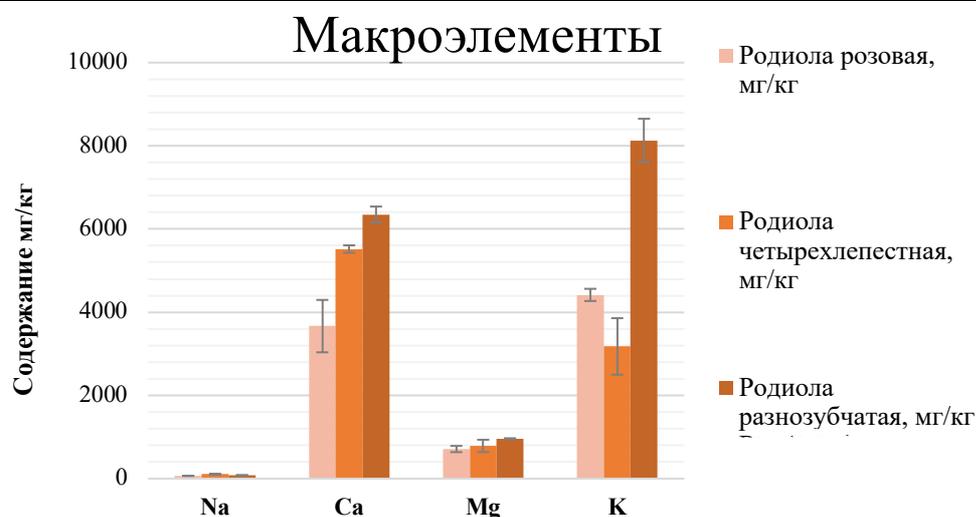


Рисунок 20 - Содержание макроэлементов в сырье 3 видов родиол

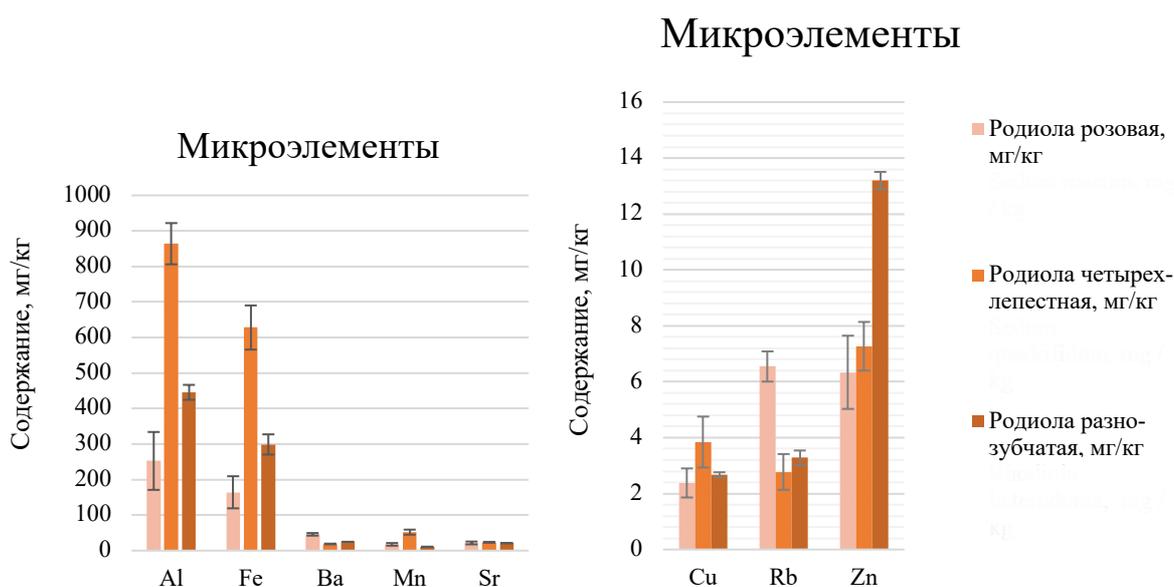


Рисунок 21 - Микроэлементный состав сырья 3 видов родиол

Представленные результаты указывают на значительные отличия в минеральном составе изучаемых видов растений рода *Rhodiola*. Так, в родиоле четырёхлепестной установлена высокая концентрация натрия и марганца, причем содержание марганца в 3 раза больше, чем в р. розовой, и в 4,9 раз больше, чем в р. разнозубчатой. Следовательно, можно подтвердить гипотезу о том, что родиолы (в частности родиола четырехлепестная) относятся к манганофилам и могут быть индикаторами почв с высоким содержанием марганца.

Содержание кальция и калия в родиоле разнозубчатой в 2 раза превышает количество данных элементов в двух других видах родиол, также в разнозубчатой установлено более высокое содержание магния и цинка.

Результаты изучения элементного анализа в траве ортилии однобокой из разных мест заготовки представлены в таблице 19 и на рис. 22-23.

Таблица 19-Минеральный профиль травы ортилии однобокой

Группа	Элемент	Содержание элементов, мг/кг*		
		(n=6, P=95%)		
		Ортилия однобокая (Казахстан), $\bar{x} \pm \Delta x_i$ $\bar{x}_{cp} \pm \Delta x_i$, RSD (%)	Ортилия однобокая (Пермь), $\bar{x} \pm \Delta x_i$ $\bar{x}_{cp} \pm \Delta x_i$, RSD (%)	Ортилия однобокая (Тюмень), $\bar{x} \pm \Delta x_i$, $\bar{x}_{cp} \pm \Delta x_i$, RSD (%)
Макроэлемент	Na	85,7 ± 0,3 0,05	139,6 ± 17,6 1,33	59,3 ± 4,6 0,82
	Ca	7019,0 ± 63,0 1,88	7685,0 ± 37,0 0,05	6481,0 ± 563,0 0,93
	Mg	1802,0 ± 275,0 1,58	1604,0 ± 1,0 0,01	1586,0 ± 121,0 0,85

	K	12670,0 ± 1938,0 1,60	12265,0 ± 435,0 0,37	10600,0 ± 99,0 0,11
Микроэлементы	Al	686,0 ± 90,0 1,41	540,0 ± 23,0 0,52	863,0 ± 25,0 0,32
	Fe	127,0 ± 6,0 0,61	98,0 ± 11 1,12	108,0 ± 10,0 0,95
	Ba	111,0 ± 28,0 4,03	62,0 ± 1,0 0,23	81,0 ± 6,0 0,92
	Cu	4,8 ± 0,70 1,74	4,9 ± 0,9 1,92	4,2 ± 0,2 0,55
	Mn	339,0 ± 29,0 8,51	228,0 ± 56,0 3,96	239,0 ± 59,0 3,97
	Rb	3,4 ± 0,2 0,97	5,60 ± 0,3 0,60	3,9 ± 0,1 0,33
	Sr	35,5 ± 7,8 2,32	49,2 ± 1,2 0,40	29,2 ± 2,1 3,72
	Zn	22,50 ± 5,60 5,01	20,80 ± 0,2 0,10	16,4 ± 2,8 1,80
Примечание: n - количество вариантов в выборке, $\bar{x}_{cp} \pm \Delta x_i$ - среднее значение выборки с доверительным интервалом, RSD - относительное стандартное отклонение, %.				

Результаты, представленные в таблице 19 указывают на то, что сырье ортилии однобокой, заготовленное из различных мест обитания имеет однопорядковый уровень накопления микро- и макроэлементов. То есть можно сделать вывод, что регион заготовки не оказывает значительного влияния на минеральный состав растений.

Высокая концентрация бария, магния, марганца и железа, обнаруженная в сырье ортилии однобокой, заготовленной в Казахстане, может свидетельствовать о техногенном загрязнении места заготовки. Однако содержание марганца в траве ортилии однобокой из всех районов заготовки

значительно превышает (в 10 раз) концентрацию данного элемента в сырье родиолы, которую относят к растениям - манганофилам [129].

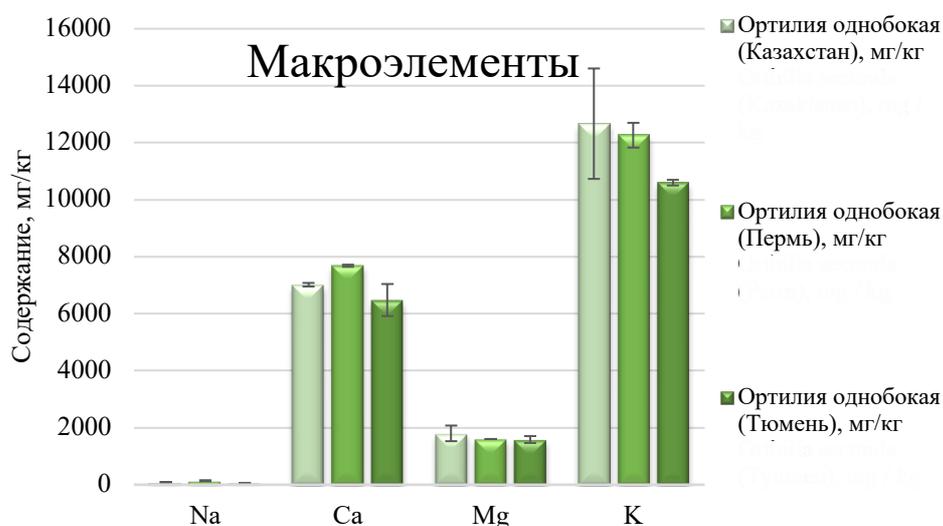


Рисунок 22- Макроэлементный состав сырья ортилии однобокой из трех регионов заготовки

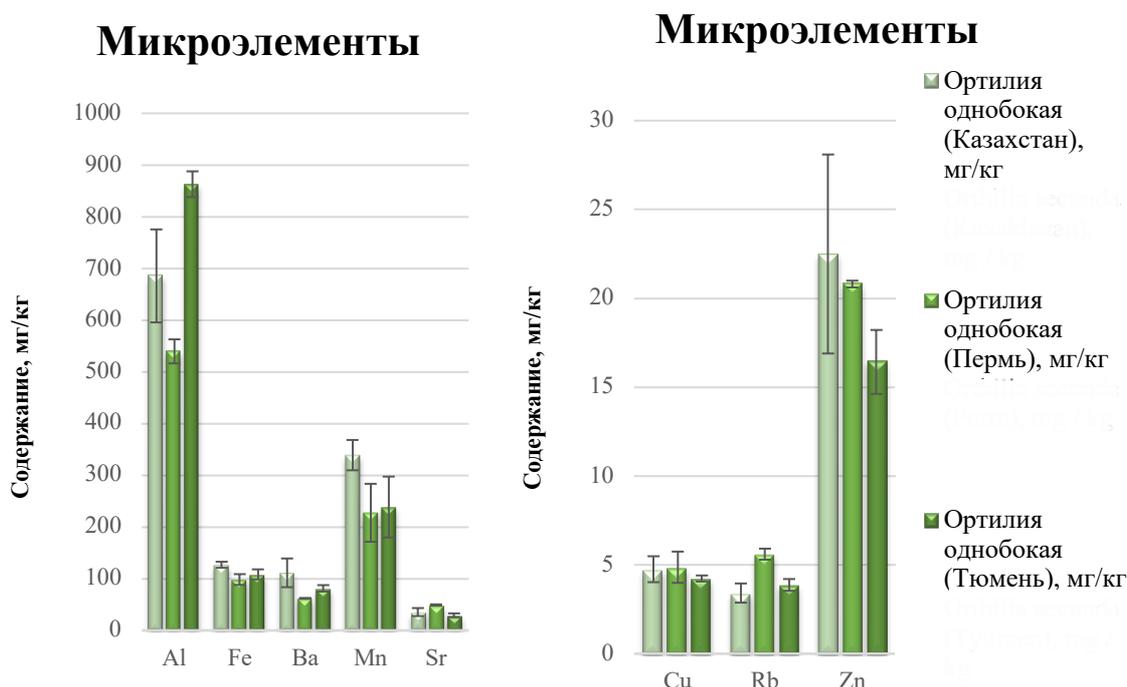


Рисунок 23 - Микроэлементный профиль травы ортилии однобокой из трех регионов заготовки

В результате исследования установлены видовые отличия в минеральном профиле растений рода *Rhodiola*. Среди них родиола четырехлепестная отличается высоким содержанием большинства

обнаруженных элементов, что позволяет сделать предположение о высокой концентрации комплексов элементов с БАВ, что влияет на фармакологические эффекты растения.

Трава ортилии однобокой, заготовленная в трех регионах, по минеральному составу имеет незначительные отличия, что говорит о несущественном влиянии почвенно-географических условий на минеральный состав. Обнаружена высокая концентрация марганца (в сравнении с родиолой), то есть ортилия однобокая может также служить индикатором почв, богатых солями данного элемента.

Из литературных источников [130-133] известно, что медь, цинк, железо и кальций играют важную роль в физиологии женского организма, их высокая концентрация в сырье ортилии однобокой и родиолы четырехлепестной обосновывает перспективность изучения и разработки ЛП на их основе.

Выводы к главе 3

1. В результате фитохимического скрининга методом ВЭТСХ в траве ортилии однобокой установлено наличие углеводов, аминокислот, терпеновых соединений, дубильных веществ, 4 органических кислот (аскорбиновая, яблочная, винная, лимонная). Обнаружены флавоноиды (рутин, кемпферол, гиперозид, цинарозид, мирицетин), причем их состав зависит от региона заготовки сырья. Состав ГКК и ФКК также варьирует в зависимости от места произрастания. В траве ортилии однобокой из 2 регионов заготовки (Казахстан, Тюменская область) было обнаружено присутствие арбутина и галловой кислоты.

Корневища и корни 3 видов родиол имеют особенности в фитохимическом составе органических (в т.ч. amino-) кислот, флавоноидов, веществ терпеновой структуры, ГКК, ФКК, а также специфичных фенольных соединений, характерных для растений рода *Rhodiola*.

Установленные особенности фитохимического профиля растений позволяют сформулировать критерии их стандартизации по показателю «Подлинность».

2. В гексановой фракции из сырья родиолы четырехлепестной методом ГХ-МС установлено наличие 22 компонентов, 17 из которых были идентифицированы. Определены соединения с наибольшим накоплением – этиловые эфиры линолевой, олеиновой и пальмитиновой кислот, что характерно для растительных объектов. Из летучих соединений, обуславливающих запах растений, идентифицирован только бензиловый спирт.

3. Методом ВЭЖХ количественно определено содержание родоспецифичных фенольных соединений в сырье 3 видов родиол. Установлено, что производные коричных спиртов характерны только для р. розовой и не составляют хроматографический профиль р. четырехлепестной. Но для корневища с корнями р. четырехлепестной характерно превалирование салидрозида и тирозола ($0,532 \pm 0,034\%$, и $0,021 \pm 0,018\%$ соответственно).

4. Методом ВЭЖХ оценено количество фенольных соединений в траве ортилии однобокой разных регионов заготовки. Установлено отсутствие гидрохинона во всех исследуемых образцах, но предположено наличие его производных. Наибольшее накопление арбутина установлено в траве ортилии, заготовленной на территории Казахстана - $0,021 \pm 0,001\%$. Таким образом, можно сделать вывод, что арбутин не является мажоритарным компонентом для сырья ортилии однобокой, а, следовательно, не может быть рекомендован в качестве маркерного соединения при ее стандартизации.

5. Методом УФ-спектрофотометрии установлено содержание ПФС и ГК в траве ортилии однобокой, заготовленной на территории Казахстана. Установлено, что сырье содержит $7,01 \pm 0,2\%$ ПФС и $6,64 \pm 0,15\%$ ГК, таким образом можно позиционировать ГК как основной компонент ПФС и проводить стандартизацию сырья по данному соединению.

Также методом СФМ в УФ-области было установлено содержание ГКК в пересчете на хлорогеновую кислоту в корневищах и корнях родиолы разнозубчатой ($1,51 \pm 0,004\%$), однако недостаточная специфичность данного метода и наличие других соединений этого класса БАВ не дают возможность позиционировать хлорогеновую кислоту в качестве маркерной для данного вида родиолы.

6. Установлен минеральный состав изучаемых растений. Отмечено высокое содержание марганца в траве ортилии однобокой по сравнению с сырьем 3 видов родиол, которые относятся к растениям - манганофилам. В ходе исследования установлено, что район заготовки сырья ортилии не влияет на количественное содержание минералов.

7. Высокое содержание меди, цинка, железа и кальция в сырье ортилии однобокой и родиолы четырехлепестной, может обуславливать их применение в терапии патологий женской репродуктивной системы.

8. В результате исследования выбраны маркерные группы БАВ, которые дают возможность устанавливать критерии стандартизации для сырья ортилии однобокой и родиолы четырехлепестной.

ГЛАВА 4. ВЫДЕЛЕНИЕ И УСТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ ИЗ СЫРЬЯ РОДИОЛЫ ЧЕТЫРЕХЛЕПЕСТНОЙ И ПРОГНОСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ИХ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ.

4.1 Выделение индивидуальных соединений

Из спиртового извлечения сырья родиолы четырехлепестной методом последовательной жидкость-жидкостной экстракции были получены 4 фракции различной полярности: гексановая (ГФ), этилацетатная (ЭФ), бутанольная (БФ) и водная (ВФ). Все фракции упаривали на ротационном испарителе до уменьшения объема в три раза. Далее регистрировали хроматографический профиль каждой фракции (методика представлена в пункте 2.2.3.1). Хроматограммы каждой фракции приведены на рисунке 24.

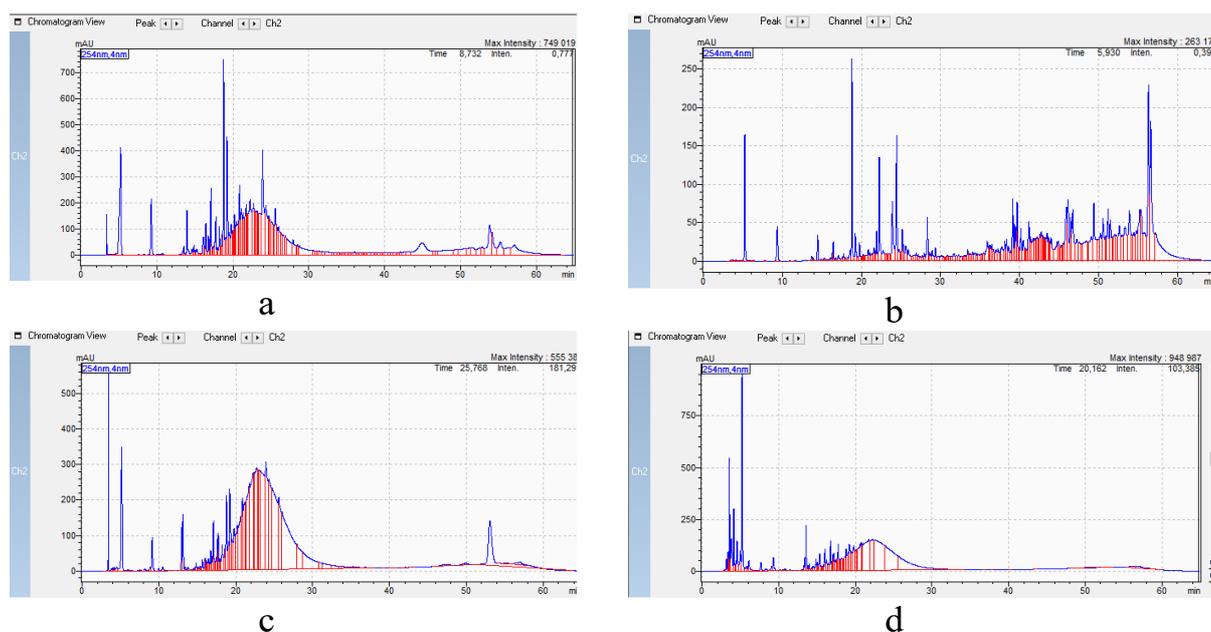


Рисунок 24 – Результаты предварительного ВЭЖХ-анализа 4 фракций:

а – этилацетатная, б – гексановая, с- н-бутанольная, d - водная

Критериями отбора для дальнейшего изучения и выделения индивидуальных соединений служили такие показатели как количество пиков и их интенсивность. Наибольшее количество пиков показала ГФ, но они были с достаточно низкой интенсивностью (порядка 250 mAU). Кроме того, компоненты гексановой фракции теоретически содержат липофильные соединения, которые могут быть проанализированы методом ГХ-МС для

оценки их потенциальной научной перспективности (раздел 3.1.3). Поэтому для дальнейшей работы выбрали ЭФ, интенсивность пиков которой говорит о достаточном для выделения методом препаративной хроматографии количестве данных соединений

Выделение индивидуальных соединений из этилацетатной фракции проводили по методике указанной в пункте 2.2.3.3.

В результате было получено 9 подфракций, содержащих потенциально индивидуальные соединения, что выражалось в элюировании определенного хроматографического пика, (маркировали RQ1-9, соответственно), которые были использованы для установления структуры веществ.

4.2. Установление структуры соединений

Установление структуры индивидуальных соединений проводили методом – ^1H -ЯМР и масс-спектропии. Методики приведены в пункте 2.2.3.3.

Результаты ЯМР. По результатам ^1H -ЯМР анализа была определена структура 7 соединений (2 соединения не удалось идентифицировать указанным методом), которые представлены 3,4 – дигидроксibenзойной кислотой, 4-гидроксibenзойной кислотой, кофейной кислотой, этилгаллатом, катехином, эпикатехином и тирозолом.

Определено, что вещество RQ1 является 3,4 – дигидроксibenзойной кислотой (протокатеховая). На ^1H -ЯМР спектре 3,4-дигидроксibenзойной кислоты (рис. 25) присутствовали шесть сигналов, три из которых соответствовали СН протонам бензойного кольца, образуя единую спиновую систему типа АМХ, при δH 6.92 (1H, d, J = 8.0 Гц, H-2), 7.24 (1H, d, J = 1.9 Гц, H-6) и 7.27 (1H, dd, J = 8.0, 1.9 Гц). Остальные три сигнала в спектре относились к протонам ОН групп двух фенольных гидроксильных групп при δH 9.53 (1H, s, ОН-3) и 9.71 (1H, s, ОН-4), а также к протону СООН группы при δH 10.10 (1H, s, СООН).

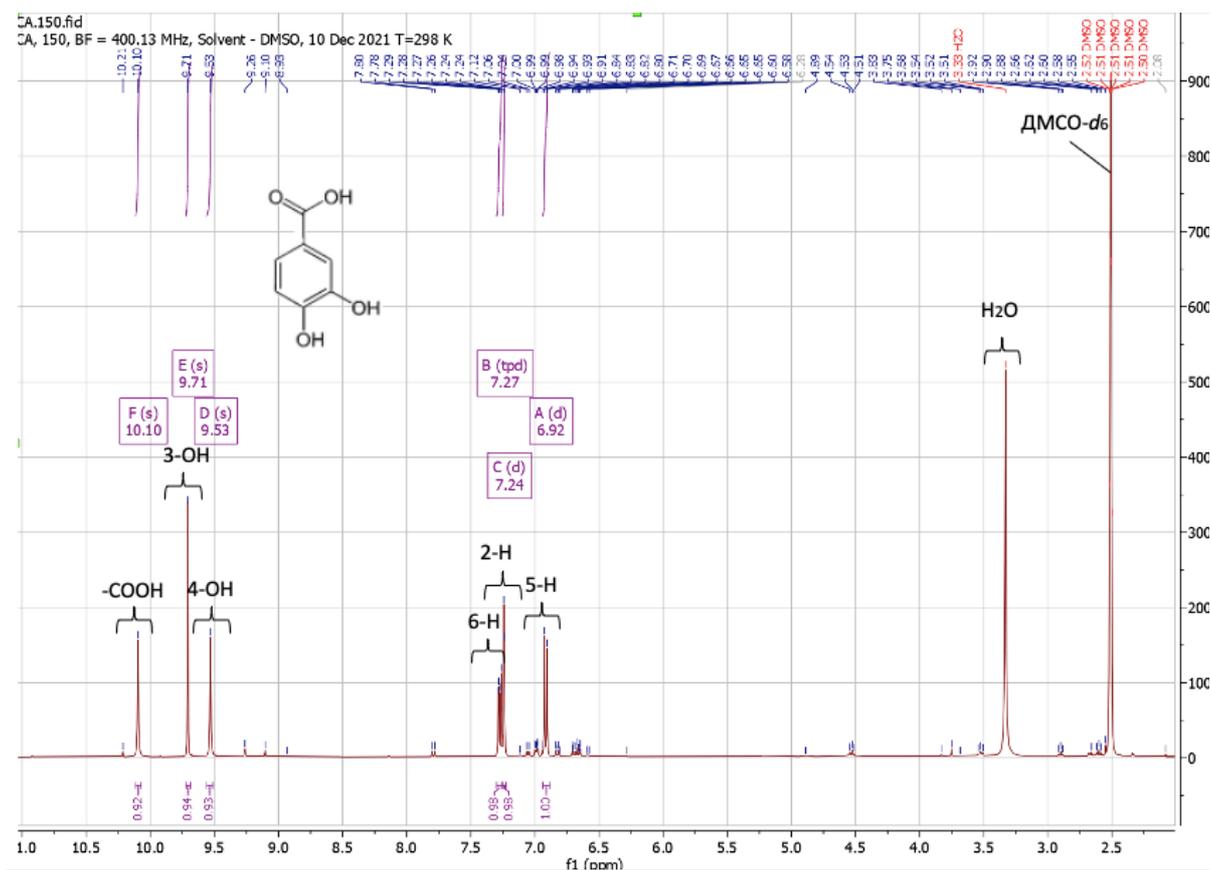
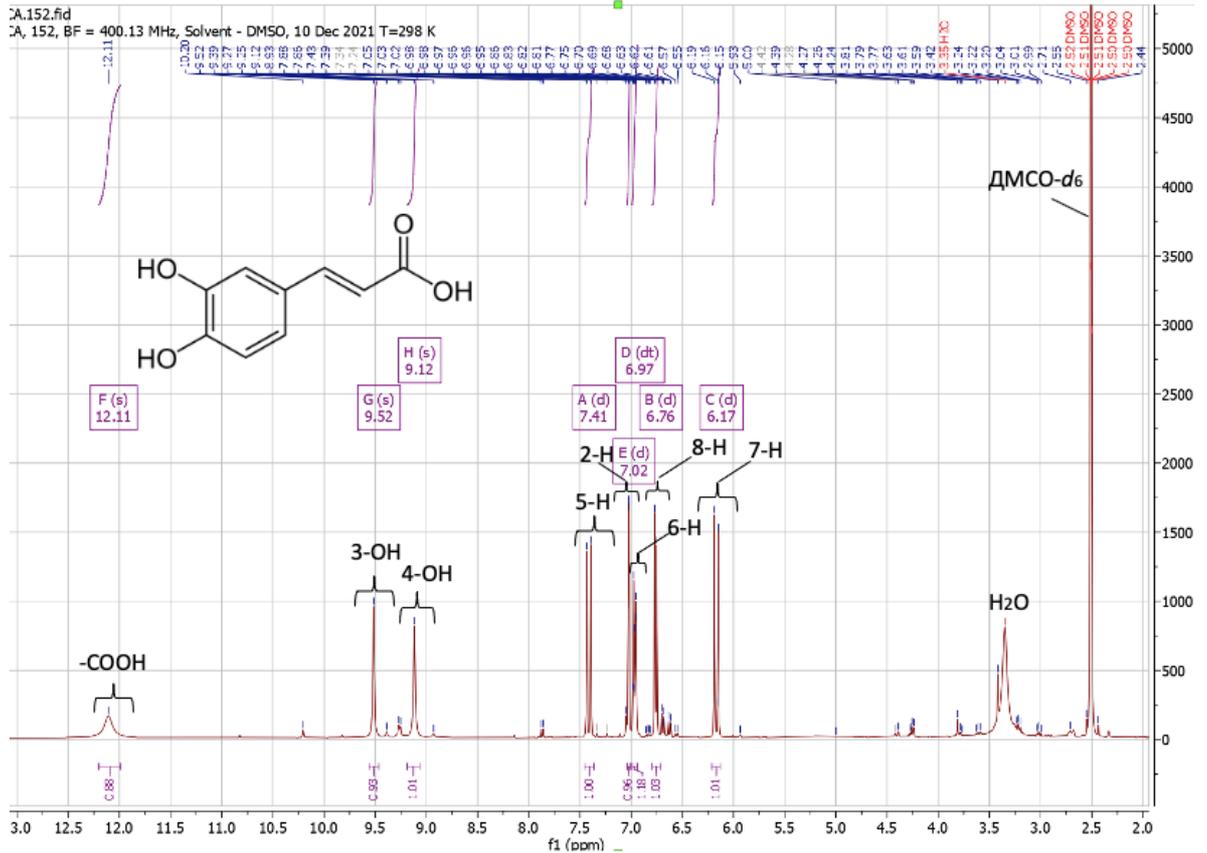


Рисунок 25 ^1H -ЯМР спектр протокатеховой кислоты

Соединение RQ 2 было идентифицировано как 4-гидроксибензойная кислота, поскольку на ^1H -ЯМР спектре (рис. 26) присутствовали четыре сигнала, два из которых соответствовали СН протонам бензойного кольца, образуя единую спиновую систему типа AA'XX', при δH 6.83 (2H, d, $J = 8.7$ Гц, H-3, H-4) и 7.79 (2H, d, $J = 8.7$ Гц, H-2, H-6). Остальные два сигнала в спектре относились к протону OH группы фенольного гидроксила при δH 10.21 (1H, s, OH-4) и к протону COOH группы при δH 12.38 (1H, s, COOH).

В ^1H -ЯМР спектре RQ 3 (рис. 27) присутствовали восемь сигналов, три из которых соответствовали СН протонам бензойного кольца, образуя единую спиновую систему типа AMX, при δH 6.76 (1H, d, $J = 8.1$ Гц, H-5), 7.02 (1H, d, $J = 2.0$ Гц, H-2) и 6.96 (1H, dd, $J = 8.1, 2.0$ Гц). Еще два СН протона образовывали спиновую систему типа AX при δH 6.17 (1H, d, $J = 15.8$ Гц, H- β) и 7.41 (1H, d, $J = 15.8$ Гц, H- α). Остальные сигналы спектра соответствовали двум протонам фенольных гидроксильных групп при δH 9.12 (1H, s, OH-3) и 9.52 (1H, s, OH-4), а также к протону COOH группы при δH 12.11 (1H, уш. s, COOH).

Рисунок 27 -¹H-ЯМР спектр кофейной кислотыРисунок 28 -¹H-ЯМР спектр этилгаллата

Полученные фракции RQ5 и RQ6 были идентифицированы как катехин и эпикатехин, соответственно. В ^1H -ЯМР спектре катехина (рис. 29) присутствовали тринадцать сигналов, соответствующие 13 протонам. В алифатической области спектра наблюдались сигналы протонов кольца С при δH 2.35 (1H, dd, $J = 16.0, 8.1$ Гц, H-4a), 2.66 (1H, dd, $J = 16.0, 5.2$ Гц, H-4b), 3.82 (1H, m, H-3) и 4.48 (1H, d, $J = 7.6$ Гц, H-2). В ароматической области наблюдались сигналы протонов кольца А, образуя спиновую систему типа АХ, при δH 5.90 (1H, d, $J = 2.2$ Гц, H-6) и 5.69 (1H, d, $J = 2.2$ Гц, H-8) и протонов кольца В, образуя спиновую систему типа АМХ, при δH 6.72 (1H, d, $J = 1.8$ Гц, H-2'), 6.68 (1H, d, $J = 8.0$ Гц, H-5') и 6.59 (1H, dd, $J = 8.0, 1.8$ Гц, H-6'). Остальные сигналы относились к протонам фенольных гидроксиллов при δH 8.79 (1H, s, OH-3'), 8.84 (1H, s, OH-4'), 8.92 (1H, s, OH-7) и 9.16 (1H, s, OH-5).

В ^1H -ЯМР спектре эпикатехина также присутствовали тринадцать сигналов, соответствующие 13 протонам. В алифатической области спектра наблюдались сигналы протонов кольца С при δH 2.48 (1H, dd, $J = 16.5, 3.3$ Гц, H-4a), 2.66 (1H, dd, $J = 16.4, 4.3$ Гц, H-4b), 4.01 (1H, m, H-3) и 4.74 (1H, уш. S, H-2). В ароматической области наблюдались сигналы протонов кольца А, образуя спиновую систему типа АХ, при δH 5.90 (1H, d, $J = 2.1$ Гц, H-6) и 5.72 (1H, d, $J = 2.1$ Гц, H-8) и протонов кольца В, образуя спиновую систему типа АМХ, при δH 6.90 (1H, d, $J = 1.1$ Гц, H-2'), 6.66 (1H, m, H-5') и 6.66 (1H, m, H-6'). Остальные сигналы относились к протонам фенольных гидроксиллов при δH 8.80 (4H, уш. S, OH-3', OH-4', OH-7) и 9.10 (1H, s, OH-5).

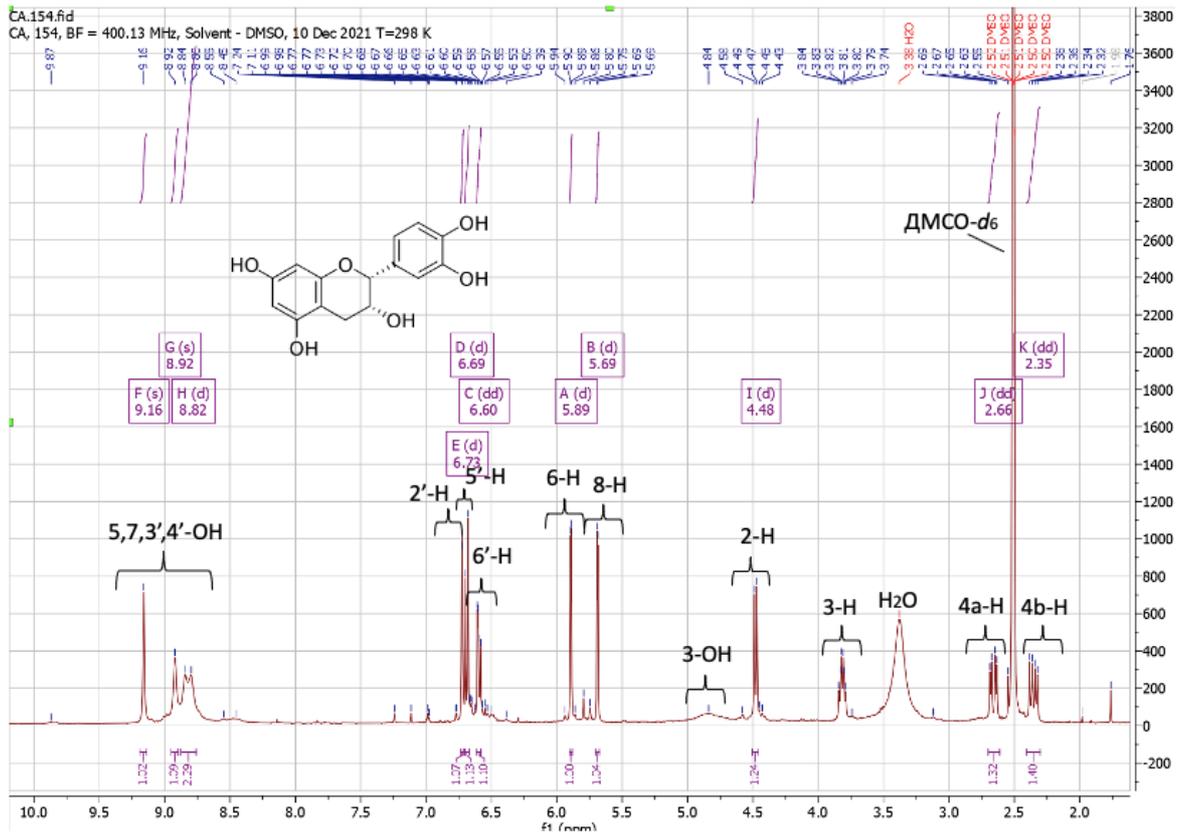


Рисунок 29 - ^1H -ЯМР спектр катехина

RQ7 был идентифицирован как тирозол (ранее индетнифицирован методом ВЭТСХ и ВЭЖХ). В ^1H -ЯМР спектре (рис. 30) присутствовали шесть сигналов, соответствующие 10 протонам. В алифатической области спектра наблюдались сигналы протонов двух CH_2 групп при δH 2.65 (2H, t, $J = 7.3$ Гц) и 3.56 (2H, t, $J = 7.3$ Гц), соответственно. Сигнал четырех ароматических протонов наблюдался при δH 6.71 (2H, d, $J = 8.3$ Гц, H-3, H-4) и 7.02 (2H, d, $J = 8.3$ Гц, H-2, H-6), образуя единую спиновую систему типа AA'XX'. Остальные два сигнала соответствовали алифатическому гидроксилу и фенольному гидроксилу при δH 4.56 (1H, уш. s) и 9.13 (1H, уш. c), соответственно.

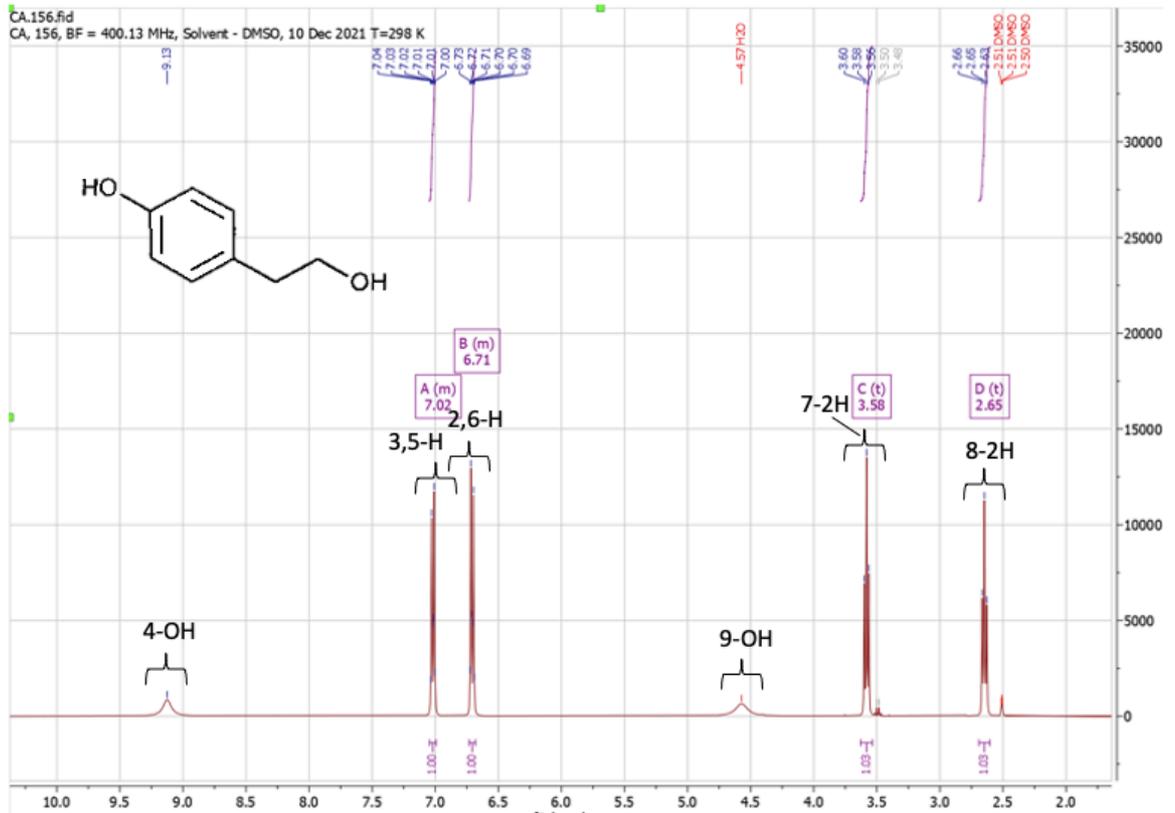
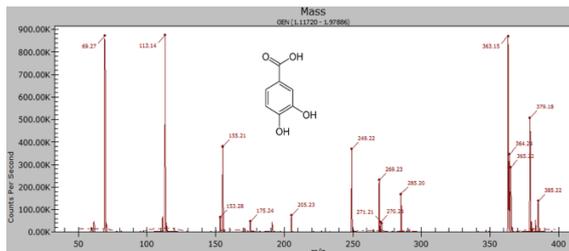
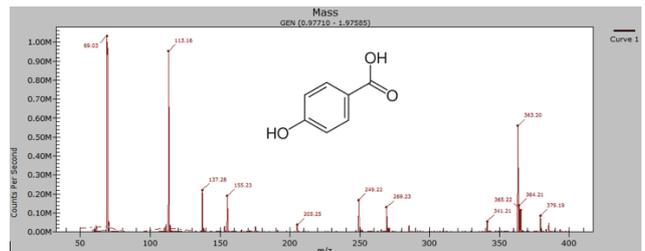


Рисунок 30 - ¹H-ЯМР спектр тирозола

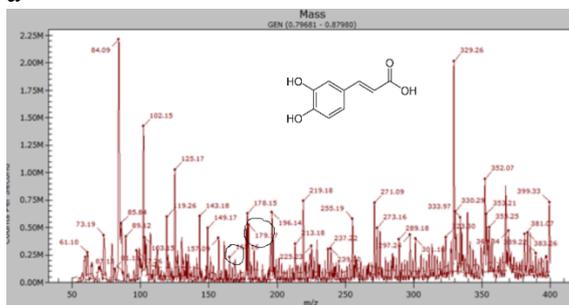
Масс-спектроскопия. Структуру выделенных соединений дополнительно подтверждали методом масс-спектрометрии. Пробоподготовка и режим ионизации приведены в разделе 2.2.3.2. Масс-спектры выделенных соединений приведены на рисунке 31.



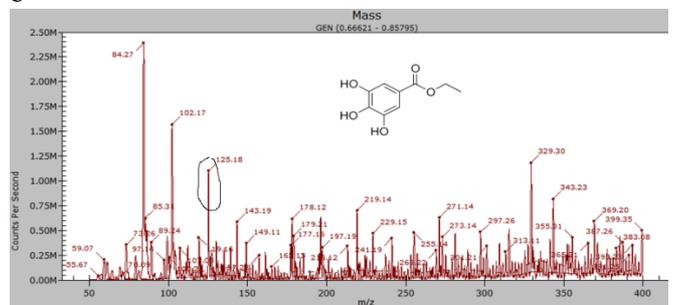
a



b



c



d

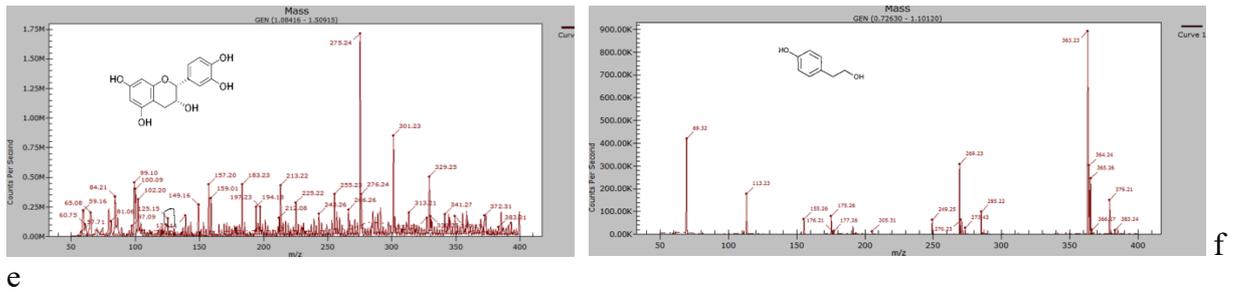


Рисунок 31 – масс-спектры выделенных соединений

На масс-спектрах идентифицируются полосы со значением m/z 153 (-) (рис. 31а), характерными для молекулярного иона протокатеховой кислоты, m/z (-) 137 (рис. 31в) соответствует 4-гидроксибензойной кислоте; m/z (+) 179, 163 и 164 (рис. 31с) характеризуют осколочные ионы кофейной кислоты; m/z (+) 125 (рис. 31 d) осколочный ион, характерный для этилгаллата; m/z (+) 139 (рис. 31 e) характеризует осколочный ион катехина/эпикатехина; осколочный ион m/z (+) 175, характерный для тирозола (рис. 31 f).

Данные соединения впервые установлены и выделены из сырья родиолы четырехлепестной. Они являются мажоритарными соединениями (максимальные по накоплению) и могут характеризовать фитохимический профиль сырья и определять направления фармакологической активности.

4.3. *In silico* прогноз фармакологической активности выделенных индивидуальных соединений

Прогностическую оценку фармакологической активности для выделенных соединений проводили с помощью программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances) [126]. Наиболее прогнозируемые фармакологические эффекты с оценкой двух вероятностей (вероятность наличия (Pa) и отсутствия (Pi) активности), пороговые значения которых составляют $Pa - Pi \geq 0,9$ для каждого выделенного соединения, представлены в таблице 20. Установлено, что все выделенные соединения демонстрируют высокую вероятность целевых фармакологических эффектов, но наиболее перспективными соединениями для дальнейшего изучения фармакологической активности являются протокатеховая и 4-гидроксибензойная кислоты, поскольку число вероятных фармакологических эффектов при $Pa - Pi \geq 0,9$ более 50.

Таблица 20 – Прогностическая оценка фармакологической активности индивидуальных соединений Родиолы четырехлепестной

Прогнозируемая фармакологическая активность ($P_a - P_i \geq 0,9$)	Биологически активные вещества					
	Протокатеховая кислота	п-гидроксибензойная кислота	Кофейная кислота	Этилгаллат	Катехин /эпикатехин	Тирозол
Ингибитор тестостерон 17бета-дегидрогеназы (НАДФ+)	0,952	0,957	-	-	-	0,862
Ингибитор хлордекон редуктазы	0,963	0,967	0,902	0,906	0,877	0,912
Агонист целостности мембран	0,910	0,908	0,955	0,905	0,983	0,924
Антисептическая	0,906	-	-	-	-	-
Антисеборейное действие	-	0,902	-	-	-	0,875
Ингибитор аспульвинон диметилаллилтрансферазы	0,922	0,931	-	0,910	-	0,928
Ингибитор дегидро-L-гулонатдекарбоксилазы	0,959	0,964	-	-	-	-
Ингибитор арилацетонитрилазы	0,957	0,952	-	-	-	-
Субстрат CYP2C12	-	-	-	-	0,909	0,923
Протектор мукозомембран	-	-	0,945	-	0,962	-
Ингибитор глутатионтиолэстеразы	0,954	0,959	-	-	-	-
Ингибитор монодегидроаскорбатредуктазы (НАДН)	0,935	0,945	-	0,905	-	-
Ингибитор катехол-1,2-диоксигеназы	0,931	0,923	-	-	-	-
Ингибитор ферулоилэстеразы	0,919	-	0,977	0,877	-	0,890
Ингибитор убихинол-цитохром-с-редуктазы	0,923	0,932	-	-	-	0,912
Ингибитор сахарофосфатазы	0,942	0,949	-	0,894	-	-
Ингибитор треонинальдолазы	0,944	0,951	-	-	-	-

В таблице 20 показаны наиболее вероятные эффекты выделенных индивидуальных соединений. Установлено, что данные вещества обладают разными фармакологическими эффектами несмотря на схожесть химических структур (например, протокатеховая и п-гидроксибензойная кислота).

Необходимо отметить, что прогностические фармакологические эффекты мажоритарных соединений обуславливают применение данных растений при терапии патологий гинекологического профиля. Так, по информации из литературных источников [134] известно, что фермент тестостерон 17 β -дегидрогеназы (НАДФ+) может участвовать в развитии таких гормонозависимых патологий, как рак молочной железы, яичников, эндометрия. Таким образом, исходя из данных таблицы 20 можно предположить, что 3,4-дигиброксibenзойная и 4-гидроксибензойная кислоты (а также тирозол, но с (Pa-Pi \geq 0,8)) обладают потенциальным прогностическим противоопухолевым эффектом за счет ингибирования указанного фермента. Перспективным направлением для дальнейшего изучения являются антисептический (3,4-дигиброксibenзойная) и антисеборейный эффекты (п-гидроксибензойная кислота).

В ходе прогнозирования фармакологической активности определено, что все соединения с большой долей вероятности могут выступать в качестве ингибиторов хлордекон редуктазы (фермент, расщепляющий хлордекон – сельскохозяйственный пестицид [135]) и агонистов целостности мембран, формируя тем самым направление для дальнейших фармакологических исследований.

Прогностическая оценка направлений фармакологической активности выделенных соединений создает предпосылки для разработки и стандартизации растительных препаратов на основе сырья родиолы четырехлепестной.

Выводы к главе 4

1. Из сырья родиолы четырехлепестной методами колоночной и препаративной хроматографии впервые выделено 9 соединений, для 7 из которых была определена химическая структура.

2. Методом ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии доказана структура 7 мажоритарных соединений, выделенных их корневищ с корнями родиолы четырехлепестной - протокатеховой кислоты, 4-гидроксibenзойной кислоты, кофейной кислоты, этилгаллата, катехина и эпикатехина, а также тирозола. Два из выделенных соединений (кофейная кислота и тирозол) были обнаружены на этапе фитохимического скрининга методом ВЭТСХ и ВЭЖХ, что подтверждает правильность сделанных выводов.

3. Мажоритарное накопление предшественников дубильных веществ – катехина, эпикатехина, этилгаллата – дает возможность предположить превалирование данной группы БАВ в сырье родиолы четырехлепестной и обосновать специфическую окраску данного сырья.

4. Для 7 выделенных соединений была проведена *in silico* оценка фармакологического потенциала в программе PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances). Определены наиболее перспективные соединения – протокатеховая и 4-гидроксibenзойная кислоты - которые показали наибольшее количество эффектов (более 50) при $P_a-P_i \geq 0,9$.

5. Установленные фармакологические активности – в частности, способность ингибировать тестостерон 17 β -дегидрогеназу (НАДФ+) и хлордекон редуктазу - обуславливают перспективность использования сырья родиолы четырехлепестной для терапии гинекологических патологий, разработки фитопрепаратов на ее основе и дальнейшего подтверждения фармакологической активности в исследованиях *in vivo*.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ СЫРЬЯ ОБЪЕКТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

5.1. Стандартизация травы ортилии однобокой

5.1.1. Морфолого-анатомический анализ травы ортилии однобокой

Изучение макро- и микроскопических диагностических признаков травы ортилии однобокой проводили в соответствии с методиками указанными в пункте 2.2.1.1. Для макро- и микроскопического исследования использовали траву ортилии однобокой, заготовленной в Березовском районе Пермского края.

Макроскопический анализ (внешние признаки). Цельное сырье ортилии однобокой представляет собой облиственные стебли длиной до 15 см, не ветвистые, тонкие, ребристые (характерно наличие двух выступающих ребер). Листья расположены у основания стебля (розеточные), простые, короткочерешковые, овальные с заостренной верхушкой, край пильчатый, сверху темно-зеленые, снизу – светло-зелёные. Длина листовой пластинки 2–3,5 см, ширина до 3 см. Жилкование перисто-сетчатое, главная жилка выступает с нижней стороны листа. Черешки с желобом, голые, темно-зеленого цвета, длиной до 1,5 см. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка вяжущий.



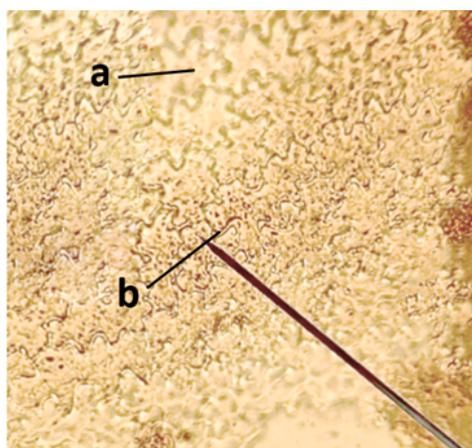
Рисунок 32- Измельченная трава ортилии однобокой

цвета.

Измельченное сырье (рисунок 32) при просмотре невооруженным глазом и под лупой (10×) представляет собой кусочки листьев и стеблей различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями 7 м. Стебли ребристые, белые на изломе. Кусочки листьев от светло-зеленого до темно-зеленого

Цвет измельченного сырья желтовато-зеленый или зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка вяжущий.

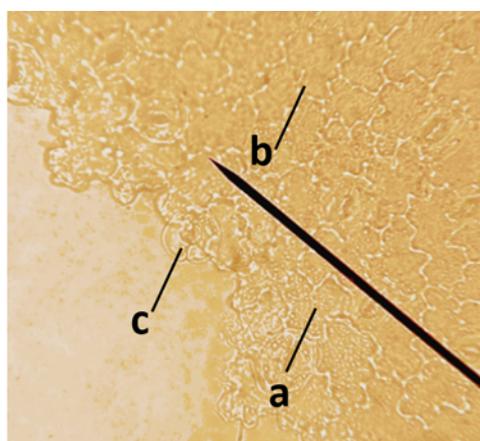
Микроскопический анализ. Препарат листа с поверхности. При рассмотрении препарата видны клетки эпидермиса с чётковидно утолщенными извилистыми клеточными стенками (рис. 33 А). Клетки эпидермы верхней и нижней стороны листа сходны по форме (рис. 33 А, Б). Устьица овально-округлой формы располагаются только на нижней стороне листовой пластинки (гипостоматический тип листа) (рис. 33 Б, В). Устьичный аппарат аномоцитного типа имеет от 2 до 6 околоустьичных клеток. Трихомы отсутствуют.



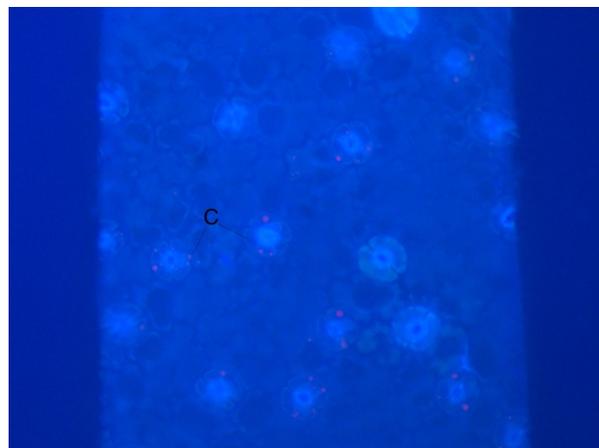
А



Б



В



Г

Рисунок 33 – Препарат листа ортилии однобокой с поверхности ($\times 40$). А – верхняя сторона листовой пластинки; Б, В – нижняя сторона листовой пластинки, Г - нижняя сторона листовой пластинки при просмотре в УФ-свете $\lambda=366\text{nm}$. а - эпидермис, b - утолщения клеточной стенки, с - устьица

Препарат поперечного среза листа. На поперечных срезах листа диагностируется кутикула, особенно развитая на верхней стороне листа (рис. 34). Для мезофилла листа характерно отсутствие деления на палисадную и

губчатую ткань. Обнаруживается гомогенное строение хлоренхимы, состоящей из округлых клеток, расположенных в 4-5 слоев. В центральной жилке листа - закрытый коллатеральный проводящий пучок (рис. 34).



Рисунок 34 – Поперечный срез листа ортилии однобокой (а - $\times 20$; б – $\times 800$)

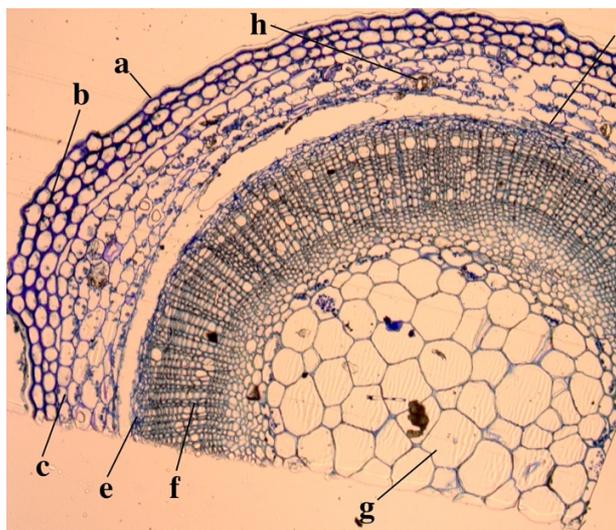
а — кутикула, б — клетки мезофилла, с — хлоренхима, d — устьица, е — закрытый коллатеральный проводящий пучок

Препарат поперечного среза стебля. Стебель имеет вторичное непучковое строение – флоэма и ксилема располагаются кольцами (рис. 35 А). Покровная ткань стебля - эпидерма, покрыта кутикулой. Под ней располагаются 3–4 ряда клеток уголковой колленхимы. Первичная кора состоит из 4–5 рядов паренхимных клеток. В клетках коры заметны крупные включения – друзы оксалата кальция (рис. 35 Б). После окраски препарата раствором Люголя в первичной коре были идентифицированы многочисленные крахмальные зерна (рис. 35 Б i).

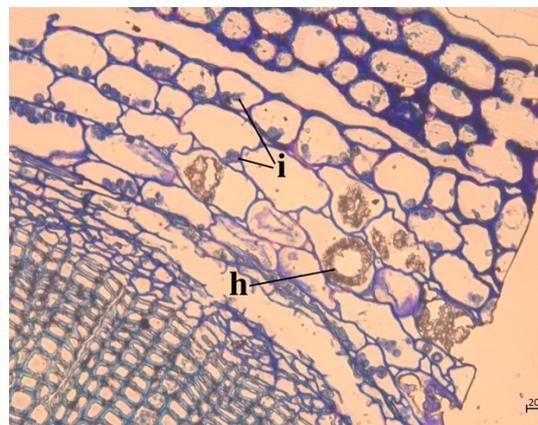
Камбиальный слой слабо дифференцирован. В ксилеме заметны годовичные кольца в количестве 2–3. Клетки сердцевины тонкостенные, крупные (рис. 35 А).

Проведенные исследования позволили установить следующие анатомические признаки травы ортилии: клеточные стенки эпидермиса четковидно утолщенные, гипостоматический тип листа, устьичный аппарат

аномоцитного типа, в мезофилле нет разделения на палисадную и губчатую ткань, стебель непучкового типа строения.



А



Б

Рисунок 35 А(×10), Б(×40) – Поперечный срез стебля ортилии однобокой

а — эпидерма + кутикула, b — колленхима, с — первичная кора, d — флоэма, e — камбий, f — ксилема, g — клетки сердцевины, h — друзы оксалата кальция, i – крахмальные зёрна

5.1.1. Установление фармакопейных числовых показателей травы ортилии однобокой

Товароведческий анализ проводили в соответствии с пунктом 2.2.1.2. Оценивали такие показатели как влажность, золу общую и нерастворимую в 10% растворе хлористоводородной кислоты. Результаты исследования представлены в таблице 21.

Таблица 21 - Числовые показатели травы ортилии однобокой

Серия	Зола общая, %	Зола нерастворимая в HCl, %	Влажность, %
050618	4,48	0,22	6,4
170718	4,03	0,24	6,4
130718	4,39	0,20	6,3
150819	4,36	0,22	6,5
010719	4,43	0,24	6,4
040819	4,15	0,21	6,2
$\bar{X} \pm \Delta x$	4,31±0,07	0,22±0,01	6,37±0,04

Исходя из полученных результатов можно предложить оптимальные значения указанных показателей и установит следующие нормы: влажность - не более 10%, зола общая - не более 5,0%, зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте - не более 0,5%.

Для растительных объектов, которые используются для приготовления настоев и отваров, а также галеновых препаратов, одним из показателей качества является «сумма экстрактивных веществ». В траве ортилии однобокой данный параметр определяли с использованием воды очищенной и спирта этилового в разных концентрациях (40% и 70%).

В таблице 22 представлены результаты определения суммы экстрактивных веществ в траве ортилии однобокой. Из данных таблицы следует, что максимальное количество извлекается водой – 37,02%, что закономерно, т.к. большая часть БАВ любого растительного объекта по массе представлена веществами первичного синтеза (углеводами) и дубильными веществами, которые наряду с полисахаридами обеспечивают механическую функцию, а данные группы БАВ являются водорастворимыми.

Таблица 22 - Результаты определения содержания экстрактивных веществ в траве ортилии однобокой

Серия	Растворитель		
	Вода очищенная	спирт 40%	спирт 70%
050618	37,15	34,30	30,17
170718	36,23	34,81	30,21
130718	37,39	34,45	29,95
150819	37,18	34,63	30,13
010719	36,92	34,72	30,06
040819	37,23	34,26	30,15
$\bar{X} \pm \Delta x$	37,02±1,8%	34,53±0,5%	30,11±0,8%

Также в сырье ортилии однобокой был установлен показатель «посторонние примеси» в соответствии с видом ЛРС «травя». В исследуемых сериях доля частей растения, изменивших окраску (пожелтевшие и почерневшие) составила - 3,4 %; стебли диаметром более 1 мм - 2,9%; на органические примеси пришлось 2,6%, а на минеральные примеси - 0,89%. На основе

полученных данных были рекомендованы нормы посторонних примесей для проекта ФС (таблица 23).

Таблица 23 - Нормы посторонних примесей в сырье ортилии однобокой для проекта ФС

Показатель	Значение в ФС
части растения, изменившие окраску (пожелтевшие и почерневшие)	не более 7%
стебли диаметром более 1 мм	не более 3%
органическая примесь	не более 3%
минеральная примесь	не более 1%

Результаты определения степени измельченности сырья ортилии однобокой представлены в таблице 24.

Таблица 24 - Степень измельченности травы ортилии однобокой

Размер частиц	Цельное сырье, %	Измельченное сырье, %
Больше 7 мм	79,1±0,6	0,6±0,1
От 5 до 7 мм	15,3±0,4	73,2±0,4
От 3 до 5 мм	3,8±0,5	19,4±0,3
От 0,5 до 3 мм	1,3±0,1	5,5±0,1
Меньше 0,5 мм	0,5±0,1	1,3±0,1

Ориентируясь на данные таблицы 24, можно рекомендовать следующие нормы измельченности. Для *цельного сырья*: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм не более 2%. *Измельченное сырье*: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм не более 2%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм не более 2%.

Предложенные критерии качества и показатели их приемлемости использованы для проекта ФС «Ортилии однобокой трава».

5.1.2. Определение технологических параметров травы ортилии однобокой

Технологические параметры ЛРС используются при разработке оптимальных критериев технологии получения ЛРП, поэтому являются неотъемлемой частью фармакогностических исследований [104].

Для сырья ортилии однобокой (6 серий) были изучены такие технологические параметры как насыпная, удельная, объемная масса, порозность, пористость, свободный объем слоя и коэффициент поглощения экстрагента, результаты отражены в таблице 25.

Таблица 25 - Результаты определения технологических параметров травы ортилии однобокой

Серия	Насыпная масса, г/см ³	Удельная масса, г/см ³	Объемная масса, г/см ³	Порозность, г/см ³	Пористость, г/см ³	Свободный объем слоя сырья, г/см ³
050618	0,1551	1,3345	0,8408	0,8155	0,3699	0,8838
170718	0,1557	1,3374	0,7938	0,8039	0,4065	0,8837
130718	0,1520	1,3341	0,8043	0,8110	0,3971	0,8861
150819	0,1554	1,3352	0,8138	0,8090	0,3905	0,8836
010719	0,1549	1,3346	0,7942	0,8050	0,4049	0,8840
040819	0,1552	1,3349	0,8027	0,8067	0,3987	0,8837
$\bar{X} \pm \Delta x$	0,1547 $\pm 0,0005$	1,3351 $\pm 0,0005$	0,8023 $\pm 0,0068$	0,8085 $\pm 0,002$	0,3946 $\pm 0,032$	0,8841 $\pm 0,0004$
Коэффициенты поглощения экстрагента						
Экстрагент ⁴	V (мл)	V ₁ (мл)	P (г)	$\bar{X} \pm \Delta x$ (мл / г)		
Вода очищенная	100	61	5,012	7,78 \pm 0,20		
Спирт 40%	70	34	4,998	7,20 \pm 0,10		
Спирт 70%	70	40	5,023	5,97 \pm 0,09		
Спирт 96%	70	45	5,003	4,99 \pm 0,10		

Изученные параметры могут быть использованы для разработки оптимальных условий изготовления фитопрепаратов из травы ортилии и послужат исходными данными для характеристики и оптимизации отдельных технологических процессов.

5.1.3. Разработка проекта фармакопейной статьи на траву ортилии однобокой

Комплекс проведенных фитохимических исследований по изучению травы ортилии однобокой позволил выделить основные группы БАВ, которые положены в основу стандартизации сырья и установить нормы для оценки качества. Полученные данные стали основой проекта фармакопейной статьи «Ортилии однобокой трава», разработанной в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV. Проект ФС представлен в Приложении Б.

5.2. Стандартизация корневищ с корнями родиолы четырёхлепестной

5.2.1. Морфолого-анатомический анализ корневищ с корнями родиолы четырёхлепестной

Макро- и микроскопический анализ корневищ и корней родиолы четырёхлепестной проводили в соответствии с методиками указанными в пункте 2.2.1.1. Сырье для проведения макро- и микроскопического анализа было заготовлено в г. Барнаул Алтайского края.

Макроскопический анализ. Цельное сырье (рис. 36 Б) - куски корневищ и корней различной формы. Куски корневищ длиной до 7 см, толщиной - 1–2 см, поперечно - морщинистые, со следами отмерших стеблей. От корневища отходят многочисленные корни длиной 3-5 см, толщиной до 0,5 см. Поверхность корневища и корня матовая, темно-коричневого цвета. Цвет на изломе красный, коричнево-красный или красно-коричневый. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения вяжущий.

Основными отличиями от фармакопейного вида - родиолы розовой - является большое количество толстых, длинных корней, отходящих от корневища (у розовой корни тонкие и их число незначительно), цвет и структура поверхности, а также характерный красный цвет излома (у р. розовой - розовато-коричневый) (рис. 36) и отсутствие запаха (у р. розовой запах специфический, обусловлен присутствием гераниола).



А



Б

Рисунок 36 – Целые корневища с корнями родиолы: розовой (А) и четырехлепестной (Б)

Измельченное сырье (рис. 37) (при просмотре невооруженным глазом и под лупой (10×)) представляет собой кусочки корневищ и корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет коричнево-красный или красно-коричневый с темно-коричневыми и коричневыми вкраплениями. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения вяжущий.



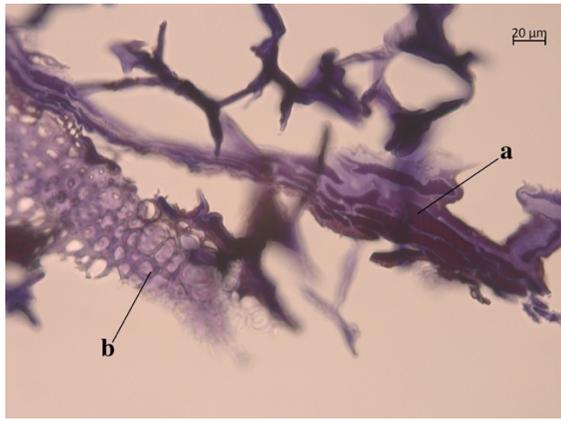
Рисунок 37 – Измельченные корневища с корнями родиолы четырехлепестной

Микроскопический анализ. Воздушно-сухое сырье родиолы четырехлепестной является очень пористым и рыхлым, в связи с чем при определении микроскопических признаков возникли трудности с получением цельного среза микропрепарата. В связи с этим изучали послойные элементы сырья родиолы четырехлепестной.

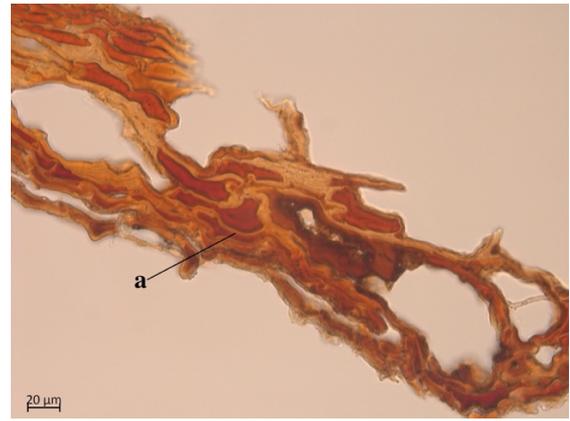
На рисунке 38 представлены микропрепараты элементов поперечного среза корневища и корней родиолы четырехлепестной до и после окраски различными реактивами (флороглюцином и серной кислотой раствором 25%, о-толуидином, суданом III) для гистохимических реакций [77]. Обработка флороглюцином и суданом не дала положительного результата, следовательно, можно сделать вывод, что лигнифицированных участков, а также клеток с эфирным маслом, в корневище родиолы четырехлепестной нет.

На поперечном срезе заметна многрядная слоистая пробка. Клетки пробкового слоя двоякие: наружные (рис. 38 Б) - уплощенные, деформированные, поперечно-вытянутые в длину, толстостенные, окрашены в интенсивно красный цвет и суберинизированы; внутренние – толстостенные, округлые, расположены в 15-20 рядов. По мере продвижения к периферии корневища / корня, клетки внутреннего пробкового слоя уменьшаются и постепенно деформируются. Под пробковым слоем наблюдается паренхима коры, клетки которой крупные, тонкостенные и содержат крахмальные зерна. Паренхима пробки практически полностью разрушена, что приводит к отслоению коры и рыхлости корневища. Все элементы коры окрашены в красно-коричневый цвет за счет содержания (предположительно) дубильных веществ группы флобафенов.

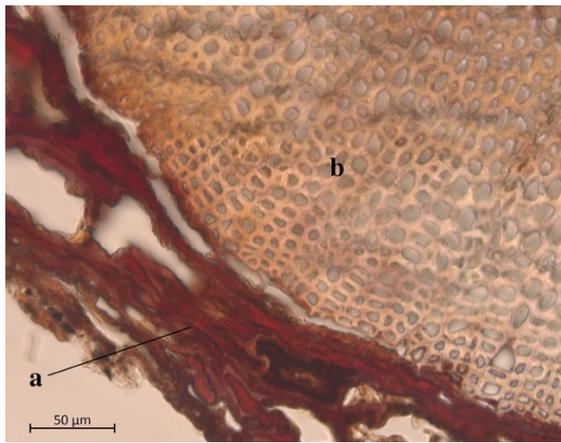
Корневище (рис. 38 D, E, F) непучкового типа строения (в отличии от родиолы розовой). На поперечном срезе дифференцирована линия камбия, наружу от которой расположена флоэма (частично разрушенная), внутрь к центру корневища радиальными рядами расположены сосуды ксилемы. Сердцевина выполнена, клетки паренхимы сердцевины крупные, тонкостенные.



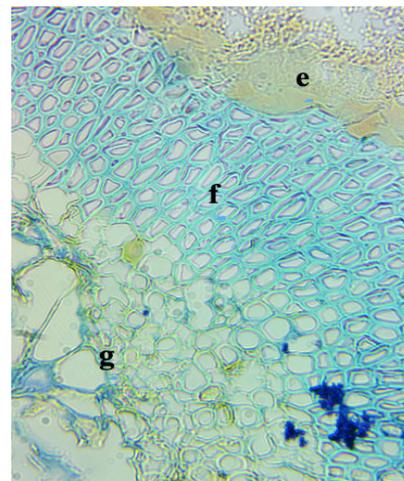
A



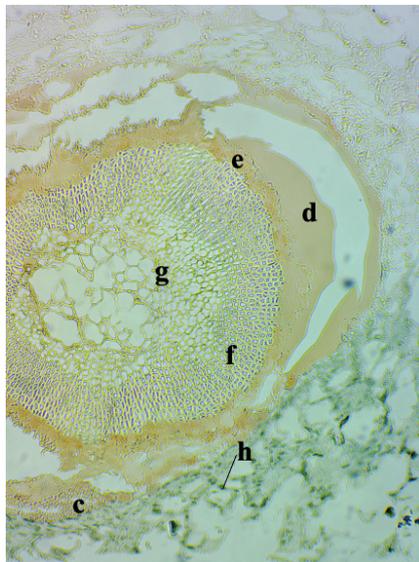
Б



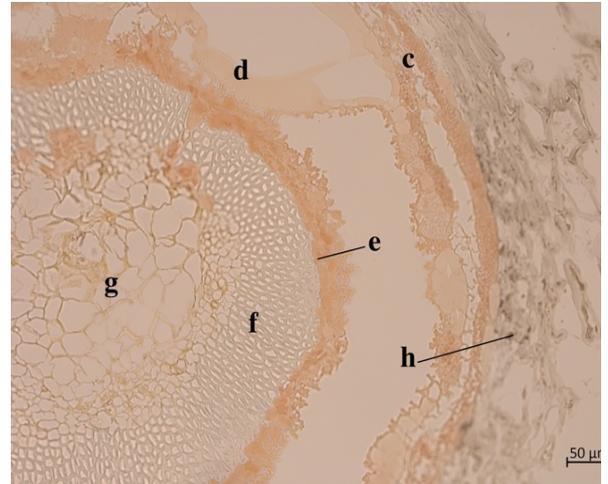
C



D



E



F

Рисунок 38 – Фрагменты поперечного среза сырья родиолы четырехлепестной: А – корня (x 40); Б – элементы пробки (x 40); С- корневище (элементы коры x 20); D – корневище после окраски о-толуидином (x400); E – корневище после окраски флороглюцином (x200); F – корневище после окраски суданом III. Примечание: а - наружные клетки пробкового слоя; b – внутренние клетки пробкового слоя; с – паренхима коры; d – флоэма; e – камбий; f – сосуды ксилемы; g – клетки сердцевины; h – зерна крахмала

Результаты изучения микроскопических признаков позволили установить, что корневище с корнями родиолы четырехлепестной кардинально отличается по типу строения от фармакопейного вида родиолы розовой. Анатомо-диагностические признаки двух видов родиол (в сравнительном аспекте) приведены в таблице 26.

Таблица 26 – Сравнение анатомо-диагностических признаков родиолы четырехлепестной и розовой

Анатомический элемент	Вид родиолы	
	четырёхлепестная	розовая [77]
Тип строения	непучковый	пучковый
Паренхима коры	присутствует, но значительно разрушена	присутствует, не разрушена
Пробка	многослойная, слоистая. Клетки пробки 2-х типов (вытянутые и округлые), дифференцируются постепенно	многослойная, слоистая. Клетки пробки 1 типа (вытянутые)
Паренхима сердцевинны	в наличии	в наличии. Содержит крахмальные зерна

5.2.2. Установление фармакопейных числовых показателей корневищ и корней родиолы четырехлепестной

Числовые показатели сырья родиолы четырехлепестной были установлены в соответствие с методикой, изложенной в пункте 2.2.1.2. Результаты представлены в таблице 27.

Таблица 27 - Числовые показатели доброкачественности сырья родиолы четырехлепестной

Серия	Зола общая, %	Зола нерастворимая в 10% HCl, %	Влажность, %
050819	6,59	2,07	8,8
290719	8,07	2,85	8,9
180719	7,43	2,71	9,1
150419	7,87	2,31	8,8
010919	7,31	2,42	8,6
240519	7,54	2,15	9,0
$\bar{X} \pm \Delta x$	7,47 \pm 0,2	2,42 \pm 0,12	8,87 \pm 0,04

Данные таблицы 27 позволили нормировать числовые критерии доброкачественности сырья родиолы четырехлепестной: зола общая - не более 10%, зола нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты - не более 3%, влажность - не более 10%.

Показатель «посторонние примеси» характерные для корневищ и корней составляют другие части растения, сырье других видов рода *Rhodiola*, органические и минеральные примеси. Результаты изучения сырья родиолы четырехлепестной по данным критериям и установленные нормы приемлемости представлены в таблице 28.

Таблица 28 – Результаты изучения и нормирования показателя «посторонние примеси» для сырья родиолы четырехлепестной

Посторонние примеси	Экспериментальные данные (n = 6)	Рекомендуемые нормы для ФС
Другие части растения (стебли, листья)	1,5±0,14%	не более 5%
Сырье других видов рода <i>Rhodiola</i>	2,1±0,43%	не более 5%
Органическая примесь	0,5±0,21%	не более 1%
Минеральная примесь	1,87±0,24%	не более 5%

Учитывая, что сырье родиолы четырехлепестной применяется в виде отваров и настойки, важным показателем качества является в этом случае сумма экстрактивных веществ. Данный показатель необходим для выбора оптимальных условий при разработке экстракционных ЛП. Результаты определения данного показателя представлены в таблице 29.

Таблица 29 - Результаты определения показателя «сумма экстрактивных веществ»

Серия	Растворитель		
	Вода очищенная	спирт 40%	спирт 70%
1	2	3	4
050819	7,24	7,01	6,79
290719	7,28	6,95	6,65
180719	7,31	6,91	6,61
150419	7,14	6,97	6,72

Продолжение таблицы 29

1	2	3	4
010919	7,22	6,94	6,69
240519	7,25	7,00	6,74
$\bar{X} \pm \Delta x$	7,24 \pm 0,01	6,96 \pm 0,04	6,70 \pm 0,01

Как показывают данные таблицы 29 сумма экстрактивных веществ незначительна и существенно не зависит от используемого растворителя. Однако тенденция соблюдается: при переходе в ряду «вода - спирт этиловый» количество экстрактивных веществ снижается.

Результаты изучения степени измельченности сырья родиолы четырехлепестной представлены в таблице 30.

Таблица 30 - Степень измельченности корневищ и корней родиолы четырехлепестной

Размер частиц	Цельное сырье, %	Измельченное сырье, %
Больше 7 мм	80,3 \pm 0,4	0,8 \pm 0,1
От 5 до 7 мм	12,7 \pm 0,7	15,4 \pm 0,1
От 3 до 5 мм	4,2 \pm 0,5	69,8 \pm 0,2
От 0,5 до 3 мм	1,9 \pm 0,1	11,2 \pm 0,2
Меньше 0,5 мм	0,9 \pm 0,1	2,8 \pm 0,1

Исходя из данных таблицы 30, можно рекомендовать следующие нормы измельченности. Для *цельного сырья*: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм не более 2%. *Измельченное сырье*: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм не более 2%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм не более 5%.

5.2.3. Определение технологических параметров сырья родиолы четырехлепестной

Результаты определения технологических параметров сырья родиолы четырехлепестной представлены в таблице 31.

Таблица 31 - Результаты определения технологических параметров корневищ и корней родиолы четырехлепестной

Серия	Насыпная масса, г/см ³	Удельная масса, г/см ³	Объемная масса, г/см ³	Порозность, г/см ³	Пористость, г/см ³	Свободный объем слоя сырья, г/см ³
1	2	3	4	5	6	7
050819	0,2080	1,3082	0,6676	0,6884	0,4897	0,8410

Продолжение таблицы 31

1	2	3	4	5	6	7
290719	0,2100	1,3074	0,6939	0,6973	0,4693	0,8394
180719	0,2090	1,3086	0,6616	0,6841	0,4944	0,8403
150419	0,2090	1,3083	0,6682	0,6872	0,4893	0,8403
010919	0,2080	1,3079	0,6712	0,6901	0,4868	0,8410
240519	0,2090	1,3086	0,6658	0,6861	0,4912	0,8403
$\bar{X} \pm \Delta x$	0,2088 $\pm 0,0003$	1,3082 $\pm 0,0002$	0,6714 $\pm 0,004$	0,6889 $\pm 0,002$	0,4868 $\pm 0,003$	0,8404 $\pm 0,0002$
Коэффициенты поглощения экстрагента						
Экстрагент	V (мл)	V ₁ (мл)	P (г)	$\bar{X} \pm \Delta x$ (мл / г)		
Вода очищенная	70	53	5,1231	3,32		
Спирт 40%	70	52,5	5,4102	3,24		
Спирт 70%	46	33	5,2629	2,47		
Спирт 96%	60	48,5	5,3270	2,16		

Примечание: V - объем экстрагента, которым заполняли сырье; V₁ - объем экстрагента, полученного после поглощения сырьем; P - масса измельченного сырья; $\bar{X} \pm \Delta x$: среднее значение коэффициента поглощения экстрагента.

На основе данных таблицы 31 можно сделать вывод, что сырье родиолы четырехлепестной является достаточно пористым и поглощает значительное количество экстрагента, что необходимо учитывать при разработке ЛРП на его основе.

5.2.4. Разработка проекта ФС на корневища и корни родиолы четырехлепестной

В результате комплексных исследований сырья родиолы четырехлепестной были выделены критерии для его стандартизации с целью дальнейшей разработки ЛП на его основе. Проект ФС «Родиолы четырехлепестной корневища и корни» разработан в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV и представлен в приложении В.

Выводы к главе 5

1. Разработаны критерии стандартизации сырья объектов исследования – травы ортилии однобокой и корневищ с корнями родиолы четырехлепестной.

2. Установлены макро- и микроскопические диагностические признаки изучаемого сырья. Для ортилии однобокой анатомо-диагностическими признаками являются: клеточные стенки эпидермиса четковидно утолщенные, гипостоматический тип листа, устьичный аппарат аномоцитного типа, в мезофилле нет деления на палисадную и губчатую ткань, стебель непучкового типа строения. Для корневищ с корнями родиолы четырехлепестной характерны: 2 типа клеток пробки (наружные – уплощенные, окрашены в интенсивно-красный цвет, суберинизированные; внутренние – толстостенные, округлые); корневище непучкового типа; флоэма частично разрушена; линия камбия представлена одним рядом клеток; сосуды ксилемы расположены радиальными рядами; клетки сердцевины крупные, тонкостенные. Данные признаки дают возможность проводить отличие родил двух видов – четырехлепестной и розовой.

3. Экспериментально установлены и нормированы числовые показатели качества травы ортилии и корневищ с корнями родиолы: зола общая, зола нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты, влажность, сумма экстрактивных веществ, посторонние примеси, степень измельченности.

4. Для целей разработки ЛРП были установлены технологические параметры сырья объектов исследования: насыпная масса, удельная масса, объемная масса, порозность, пористость, свободный объем слоя, коэффициент поглощения экстрагента.

5. На основе полученных экспериментальных данных разработано 2 проекта ФС «Ортилии однобокой трава» и «Родиолы четырехлепестной корневища и корни».

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ФИТОСУБСТАНЦИИ НА ОСНОВЕ СЫРЬЯ ОРТИЛИИ И РОДИОЛЫ ЧЕТЫРЕХЛЕПЕСТНОЙ

6.1. Подбор оптимального соотношения сырья объектов исследования в растительном сборе

Комплексное фитохимическое изучение и стандартизация травы ортилии однобокой и корневищ с корнями родиолы четырехлепестной создали предпосылки для разработки фитокомпозиции на их основе с направленным действием для терапии патологий гинекологической сферы, учитывая направления применения данных растений в виде БАД (глава 1).

В качестве лекарственной формы нами выбран сбор растительный, поскольку сборы являются препаратами выбора и занимают значительную долю на рынке фитопрепаратов 31% [34]. К тому же сбор даст возможность сохранить многокомпонентность состава БАВ изучаемых объектов и разработать критерии стандартизации с использованием параметров качества исходного сырья, что обеспечивает сквозную стандартизацию, подход, принятый в современной фармацевтической аналитике. Для разработки оптимального компонентного соотношения объектов в сборе в качестве сырья использовали траву ортилии однобокой, заготовленную на территории Пермского края и корневища и корни родиолы четырехлепестной, приобретенной в аптечной сети и, по информации на упаковке, заготовленной на территории Алтайского края.

Нами было составлено 3 варианта растительной композиции: «корневища и корни родиолы четырехлепестной - трава ортилии однобокой» в соотношениях 1:1, 1:2 и 2:1, соответственно. Оценку и последующий выбор оптимального соотношения проводили по фитохимическому составу (качественному и количественному) целевых БАВ.

6.1.1. ВЭТСХ исследование целевых компонентов фитокомпозиций

Для определения оптимального соотношения видов сырья в фотокомпозиции, был проведен фитохимический скрининг на целевые компоненты групп БАВ ортилии однобокой и родиолы четырехлепестной - галловую кислоту, салидрозид и тирозол методом ВЭТСХ по методикам, указанным в пункте 2.2.2.3.

В результате исследования присутствие ГК установлено во всех вариантах сбора, но наиболее интенсивное пятно обнаруживается у растительной композиции с соотношением компонентов родиола четырехлепестная - ортилия однобокая 2:1. Вероятно, данный факт обусловлен взаимным влиянием компонентов родиолы четырехлепестной и ортилии однобокой, к тому же из родиолы четырехлепестной выделены соединения фенольной структуры – катехин, эпикатехин, этилгаллат – которые относятся к предшественникам танинов. Результаты ВЭТСХ анализа представлены в таблице 32 и на рисунке 39.

Таблица 32 – Результаты ВЭТСХ анализа растительных сборов на содержание галловой кислоты

СО / соотношение (р:о) в сборе	Окраска в УФ- свете $\lambda = 254$ нм	УФ-свет $\lambda = 366$ нм	Rf
СО ГК	темно-серая	темно-серая	0,81
1:1	-	темно-серая	0,80
2:1	серая	темно-серая	0,80
1:2	-	темно-серая	0,80

Примечание: «р-о» - родиола четырехлепестная – ортилия однобокая.

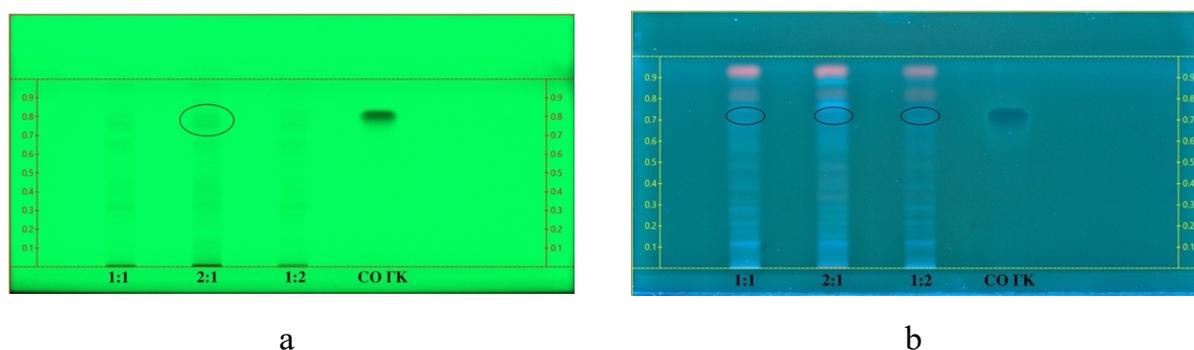


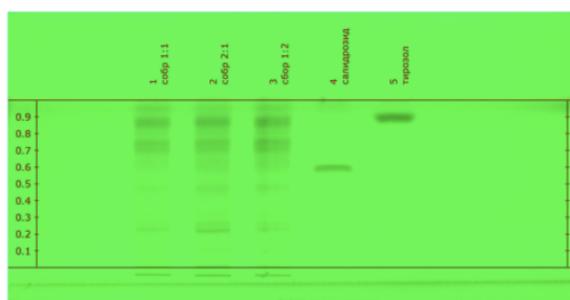
Рисунок 39- Результаты ВЭТСХ-анализа ГК в растительных сборах (детекция
а - при $\lambda = 254$ нм, б - при $\lambda = 366$ нм

Также методом ВЭТСХ были идентифицированы салидрозид и тирозол - целевые компоненты родиолы четырехлепестной. Результаты анализа представлены в таблице 33 и на рисунке 40.

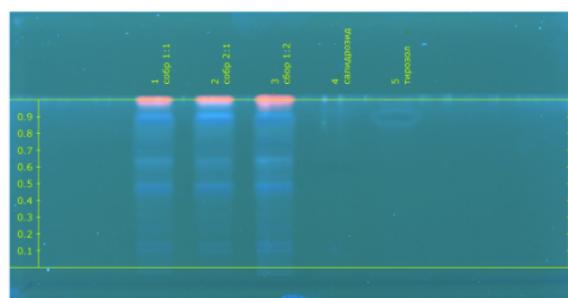
Таблица 33 - Результаты ВЭТСХ анализа растительных сборов на содержание салидрозида и тирозола

СО / соотношение (р:о) в сборе	Окраска в УФ- свете $\lambda= 254$ нм	УФ-свет $\lambda= 366$ нм	Rf
СО салидрозида	темно-серая	темно-серая	0,58
СО тирозола	темно-серая	темно-серая	0,9
1:1	серая	темно-серая	0,60
	серая	темно-серая	0,91
2:1	серая	темно-серая	0,59
	серая	темно-серая	0,91
1:2	серая	темно-серая	0,59
	серая	темно-серая	0,91

Примечание: «р-о» - родиола четырехлепестная – ортилия однобокая.



а



б

Рисунок 40- Результаты ВЭТСХ-анализа салидрозида и тирозола (детекция а - при $\lambda= 254$ нм, б - при $\lambda= 366$ нм)

По результатам исследования салидрозид и тирозол были обнаружены во всех вариантах комбинаций растительной композиции, что говорит о значительном вкладе в фитохимический состав сборов родиолы четырехлепестной.

6.1.2. Результаты количественного определения целевых компонентов сборов и валидация аналитических методик

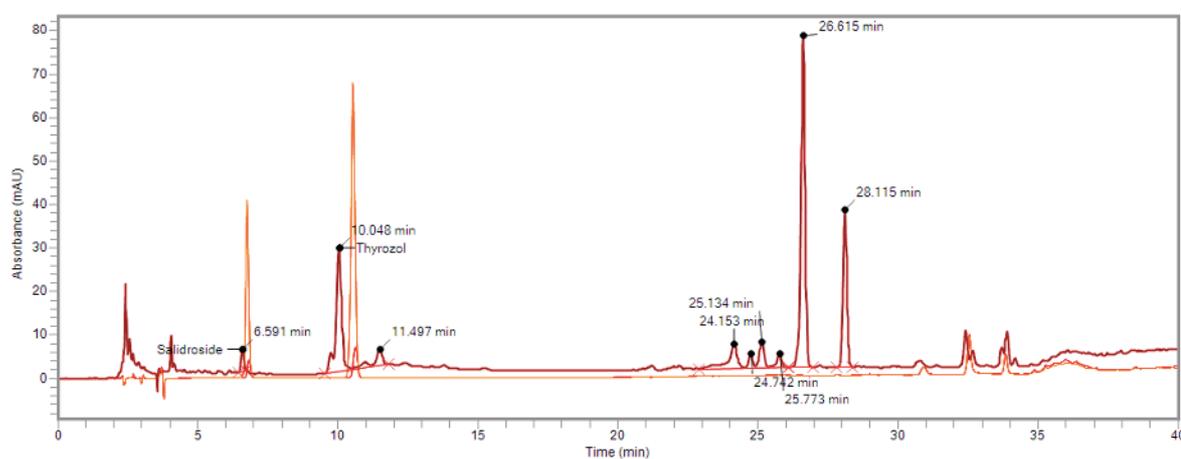
Была проведена оценка количественного содержания целевых компонентов в сборах с различным соотношением сырья методами ВЭЖХ

(салидрозид, тирозол) и УФ - СФМ (ГК) по методикам, указанным в пункте 3.1.4.3 и 3.1.4.1, соответственно.

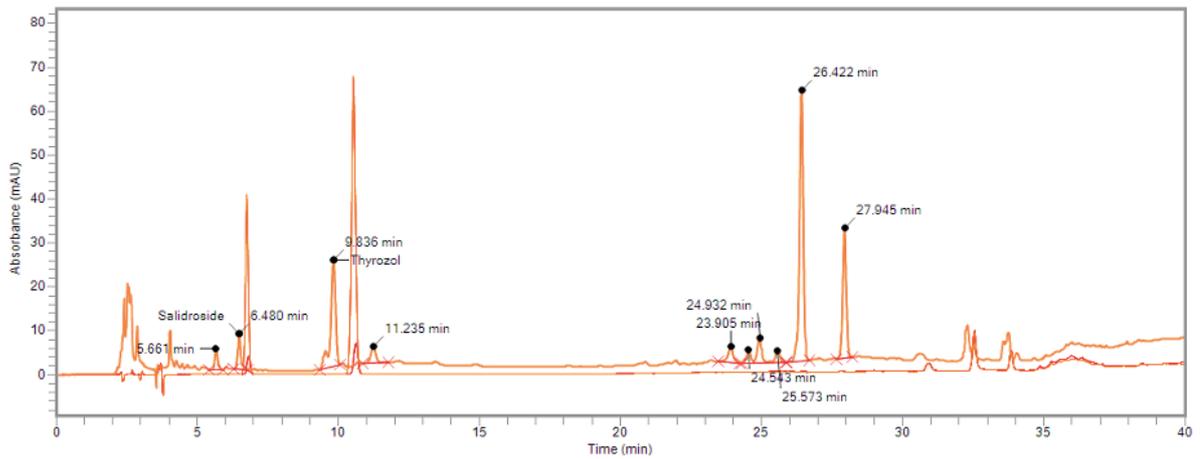
I. Результаты ВЭЖХ-анализа.

Поскольку в родиоле четырехлепестной мажоритарными компонентами являются салидрозид и тирозол, логичным этапом в изучении фитохимического профиля растительных композиций была оценка количественного содержания данных БАВ. Исследование проводили в двух видах извлечений - спиртовом (методика приготовления указана в п. 2.2.2.4) и водном (ввиду оптимального способа применения растительного сбора – приготовление отвара или настоя). Водное извлечение готовили по методике указанной на упаковке БАД из родиолы четырехлепестной по следующей адаптированной для анализа схеме: 1,0 г сырья заливали 22 мл горячей воды (100 °С), настаивали 15 минут, процеживали, отжимали, количественно переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили водой до метки.

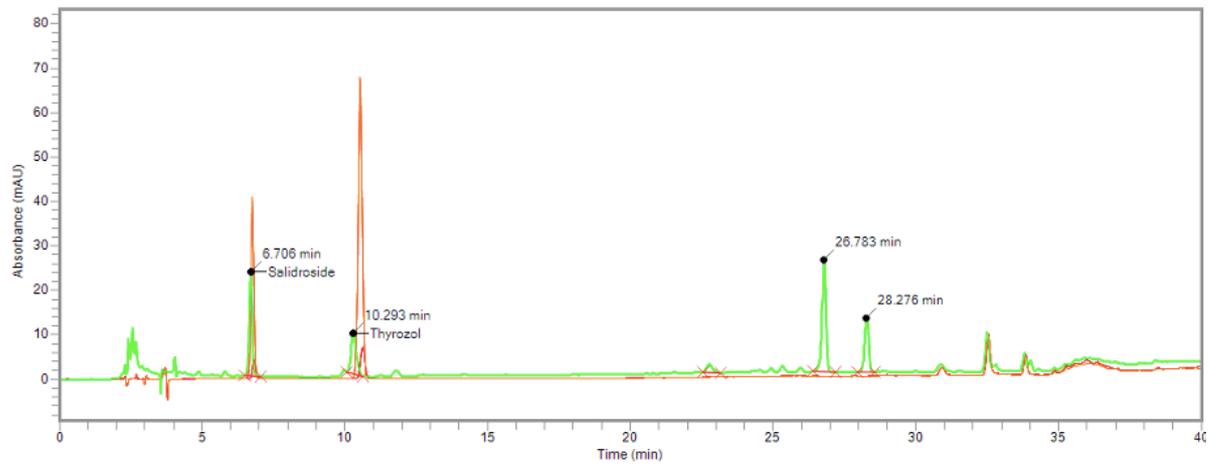
Результаты количественного определения представлены на рисунках 41-42 и в таблице 34.



A

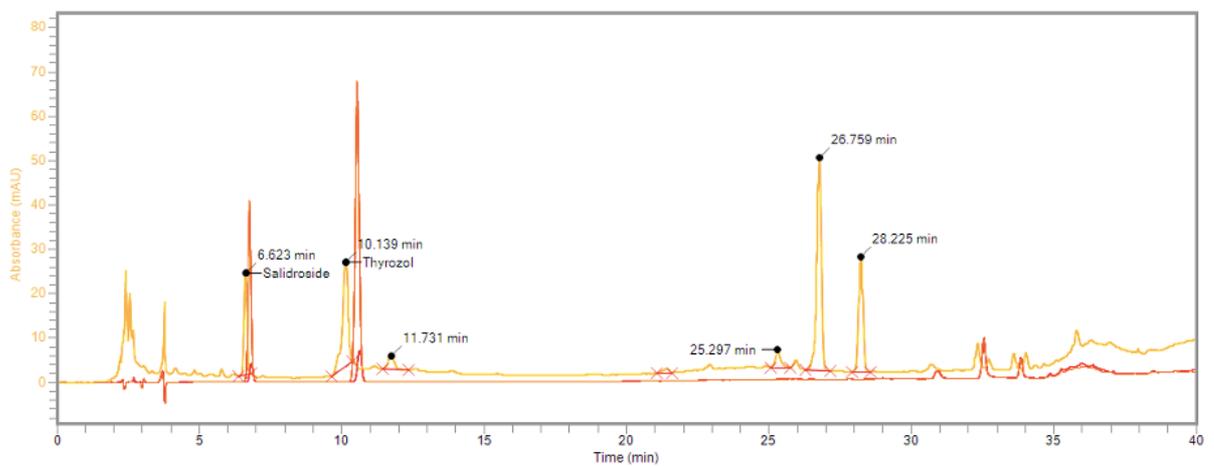


Б

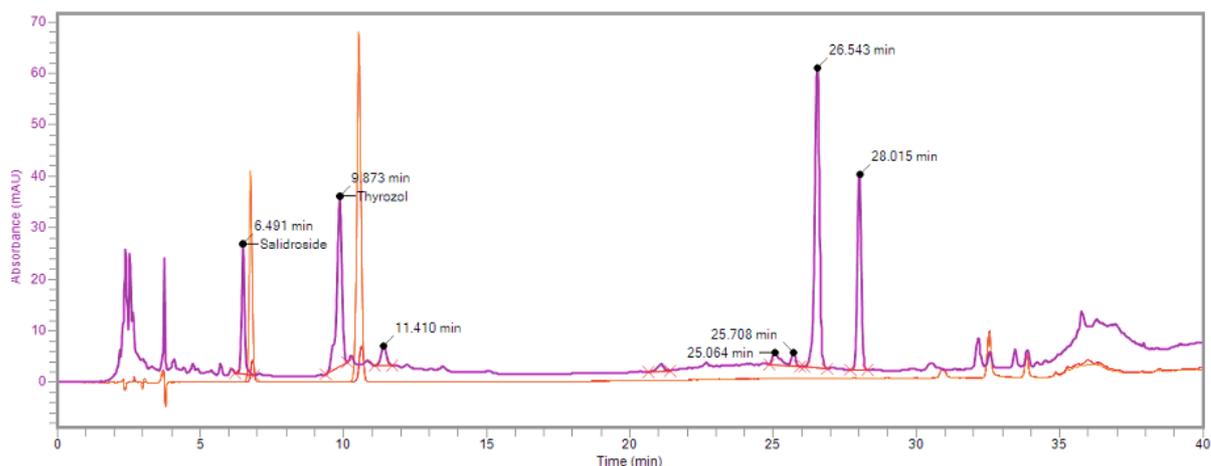


В

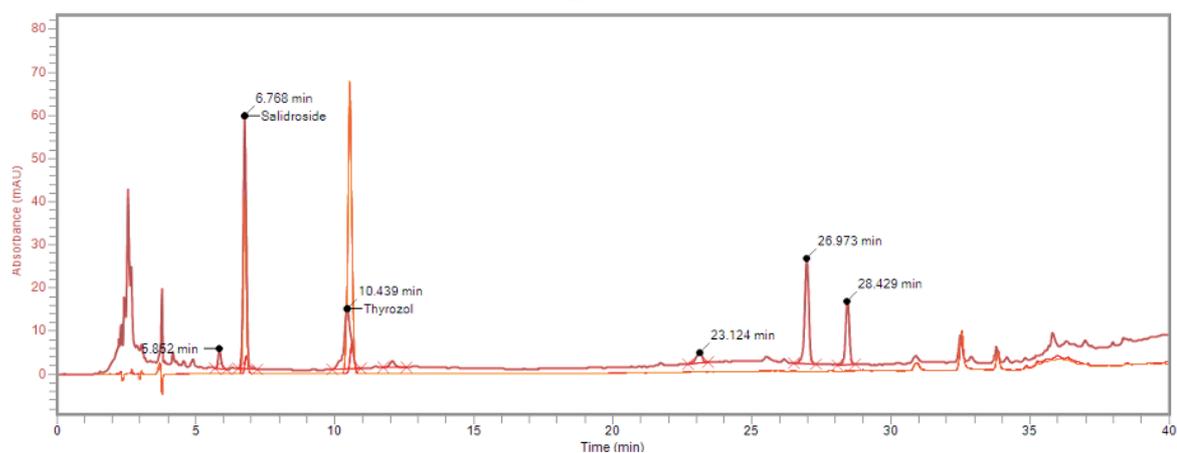
Рисунок 41 - Результаты ВЭЖХ-анализа фенольных спиртов и их гликозидов в спиртовых извлечениях сборов: А - соотношение 1:1 (оранжевый - смесь растворов СО, бордовый - испытуемый раствор); Б - соотношение 1:2 (оранжевый - смесь растворов СО, красный - испытуемый раствор); В - соотношение 2:1 (оранжевый цвет - смесь растворов СО, зеленый - испытуемый раствор, разведенный в 10 раз);



А



Б



В

Рисунок 42 - Результаты ВЭЖХ-анализа фенольных спиртов и их гликозидов в **водных** извлечениях сборов: А- соотношение 1:1 (оранжевый - смесь растворов СО, желтый - испытуемый раствор); Б - соотношение 1:2 (оранжевый- смесь растворов СО, фиолетовый - испытуемый раствор); В- соотношение 2:1 (оранжевый - смесь растворов СО, красный - испытуемый раствор).

Таблица 34 - Результаты количественного содержания салидрозида и тирозола в спиртовых и водных извлечениях растительных сборов с различным соотношением компонентов

Исследуемый объект – растительный сбор «родиола четырёхлепестная: ортилия однобокая» в соотношении		Содержание целевого компонента, $x_{cp} \pm \Delta x, \%$ ($n = 6, P=0,95$)	
		Салидрозид	Тирозол
Спиртовое извлечение	1:1	0,161±0,08	0,751±0,03
	1:2	0,278±0,01	0,609±0,02
	2:1	0,735±0,02	0,239±0,02
Водное извлечение	1:1	0,208±0,05	0,164±0,01
	1:2	0,225±0,02	0,224±0,02
	2:1	0,531±0,01	0,104±0,01

Из данных таблицы 34 следует, что салидрозид и тирозол лучше экстрагируются спиртом, что связано с природой полярности указанных БАВ. Наибольшее содержание салидрозида установлено в спиртовом извлечении ФК родиола-ортилия 2:1 - $0,74 \pm 0,02\%$, а тирозола в спиртовом извлечении 1:1 - $0,75 \pm 0,03\%$. Причем наименьшее количество тирозола (в спиртовых извлечениях) установлено при соотношении 2:1 ($0,24\%$), что является противоречием, поскольку наибольший вклад в содержание данного вещества должна давать р. четырехлепестная. Следовательно, можно предположить, что некоторые БАВ ортилии однобокой имеют схожие с тирозолом параметры удерживания.

Поскольку оптимальным способом применения растительных сборов является получение водных извлечений – отваров и настоев - следует принимать во внимание данные, полученные при экстрагировании сбора водой. Содержание тирозола во всех вариантах водного извлечения колеблется в пределах $0,10-0,22\%$, а салидрозида значительно больше при соотношении компонентов 2:1 - $0,53\%$, следовательно данное соотношение является оптимальным для использования в качестве ФК. Как видно из данных таблицы 36, при извлечении водой наблюдается схожая тенденция – количество тирозола уменьшается обратно пропорционально количеству сырья родиолы в сборе, что говорит о вкладе в данный показатель отдельных веществ ортилии.

Верификация методики ВЭЖХ. Поскольку для определения количественного содержания салидрозида и тирозола в сборах была использована валидированная фармакопейная методика, разработанная для родиолы розовой (ФС.2.5.0036.15), для доказательства ее воспроизводимости на новом объекте, необходимо провести ее верификацию.

Специфичность методики. Для доказательства специфичности методики прежде всего оценивали отсутствие влияния растворителей, используемых для получения извлечений. Хроматографические профили представлены на рисунке 43. Время удерживания пиков (3–4 минута, 30–40

минута), находящихся вне зоны нахождения целевых пиков и их интенсивность (ниже 50 mAU) доказывают отсутствие влияния растворителей на конечный результат исследования. Эти пики в дальнейшем не учитывали.

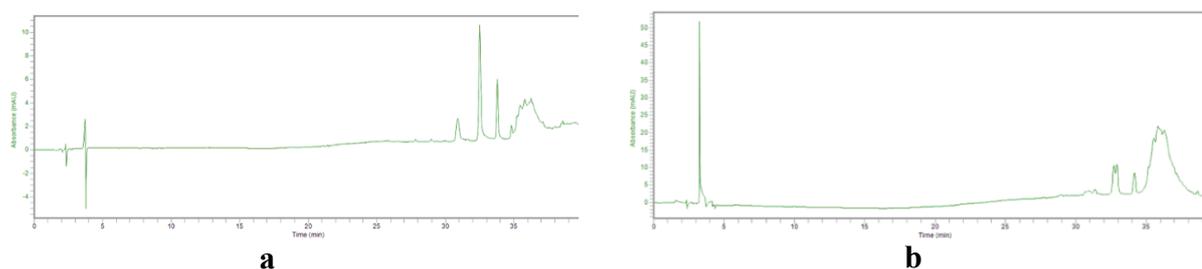
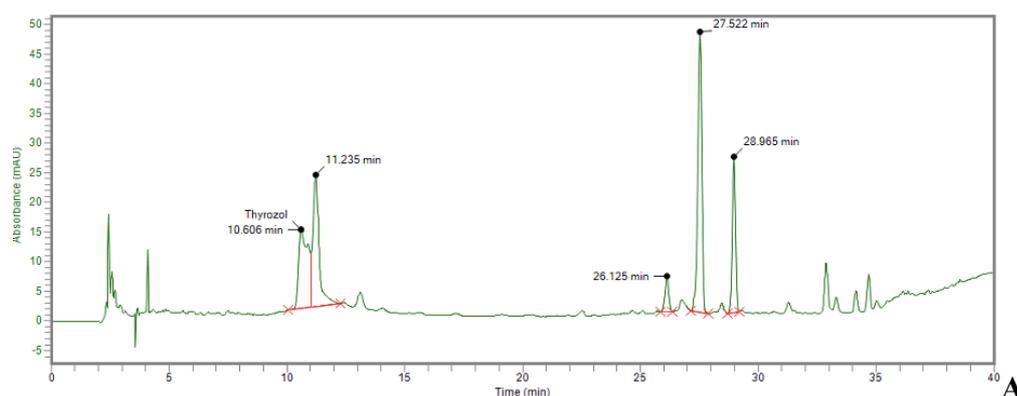


Рисунок 43 - Хроматографический профиль растворителей:
а- вода, б –спирт 70%

На хроматограммах сборов (рис. 41-42) в различных соотношениях в диапазоне 25 - 28 минут присутствуют пики, характерные для производных розавина (розарин, розадрин, розин), однако нами ранее было установлено (п. 3.1.4.1), что данные БАВ отсутствуют в родиоле четырехлепестной. Также необходимо подтверждение тезиса о том, что ортилия содержит БАВ со временем удерживания близким к тирозолу, которое вносит свой вклад в суммарное содержание компонента. Следовательно, логичным этапом доказательства валидационного критерия «Специфичность», было установление хроматографического профиля травы ортилии однобокой при данных условиях.

Для целей ВЭЖХ - анализа были получены спиртовые и водные извлечения из травы ортилии однобокой по методике указанной в п. 2.2.2.4 С. Анализ проводили в условиях для ВЭЖХ сборов. Результаты исследования хроматографического профиля травы ортилии однобокой представлены на рисунке 44.



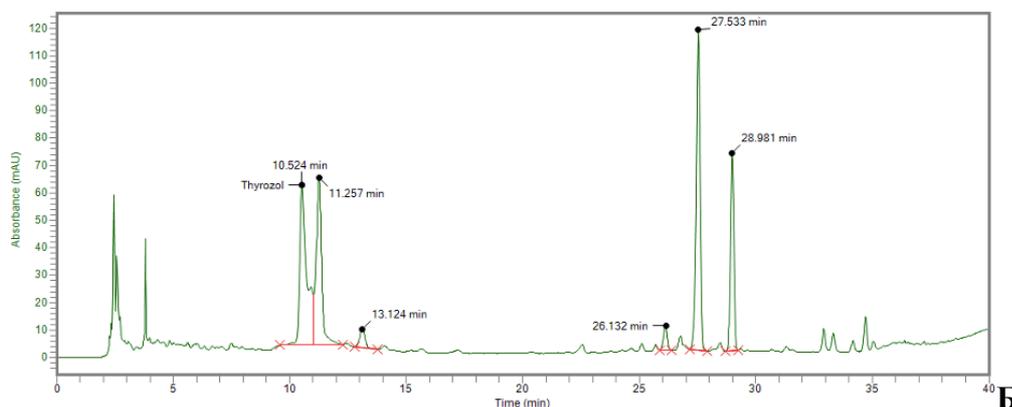


Рисунок 44 - Хроматографический профиль травы ортилии однобокой:
А-спиртовое извлечение, Б- водное извлечение

Из рисунка 44 следует, что в извлечениях из сырья ортилии однобокой содержится вещество, которое имеет время удерживания (около 10,5 минут), характерное для тирозола, поэтому оценка содержания данного компонента в сборах, не является специфичной. В то время как оценка салидрозида показательна, т.к. в извлечениях травы ортилии отсутствуют пики с временем удерживания около 6 минут, характерным для салидрозида. Также на хроматограммах извлечения травы ортилии с 25 по 29 минуты присутствуют интенсивные пики, аналогичные, представленным на хроматограммах сборов, следовательно, это доказывает отсутствие соединений группы розавина.

II. Определение содержания ГК и ПФС методом УФ-СФМ. Валидация методики определения ГК.

Для установления содержания ГК и ПФС с целью определения оптимального соотношения видов сырья в сборе использовали методики указанные в п. 2.2.2.4 А, В. Результаты представлены в таблице 35.

Таблица 35 - Количественное содержание ГК и ПФС в сборах

Растительный сбор «родиола четырёхлепестная: ортилия однобокая» в соотношении	Содержание целевого компонента, $x_{cp} \pm \Delta x, \%$ (n = 6)	
	ГК	ПФС
1:1	5,49±0,30	5,51±0,60
1:2	5,44±0,10	5,58±0,30
2:1	4,22±0,10	4,77±0,10

Из данных таблицы 35 следует, что преобладающим компонентом ПФС в сборах, как и у травы ортилии однобокой, является ГК. Причем ее

содержание при различных соотношениях видов сырья в ФК отличается менее, чем на 1,5%, следовательно, при выборе оптимального соотношения компонентов сбора, не стоит руководствоваться данным показателем.

Таким образом, опираясь на данные результатов ВЭЖХ-анализа, можно заключить, что оптимальным соотношением видов сырья в сборе родиола четырехлепестная - ортилия однобокая является 2:1.

Валидация методики КО ГК методом УФ-СФМ. С целью подтверждения достоверности и надежности адаптированной методики количественного определения ГК были проведены валидационные испытания в соответствии с ОФС 1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [77]. Валидацию проводили по следующим характеристикам: специфичность, прецизионность, линейность, правильность и устойчивость.

Растворы различных концентраций при валидации разработанных методик готовили путем изменения аликвоты испытуемого раствора по схеме, приведенной в таблице 36.

Таблица 36 – Алгоритм приготовления испытуемых растворов для проведения валидационных испытаний

Уровень концентрации, %	Аликвота раствора А (мл)	Объем раствора Б (мл)	Аликвота раствора Б (мл)	Объем раствора С (мл)
70	0,7	25	1,0	10
80	0,8	25	1,0	10
90	0,9	25	1,0	10
100	1,0	25	1,0	10
110	1,1	25	1,0	10
120	1,2	25	1,0	10

Специфичность. Критерием приемлемости параметра является совпадение максимумов УФ-спектров поглощения раствора СО галловой кислоты (рис. 45 а) в боратном буфере рН 9,0 (максимум поглощения при 286 нм) и водного извлечения сбора в боратном буфере рН 9,0 (максимум поглощения при 286 нм), а также отсутствием поглощения растворителя - боратного буфера (рис. 45 б).

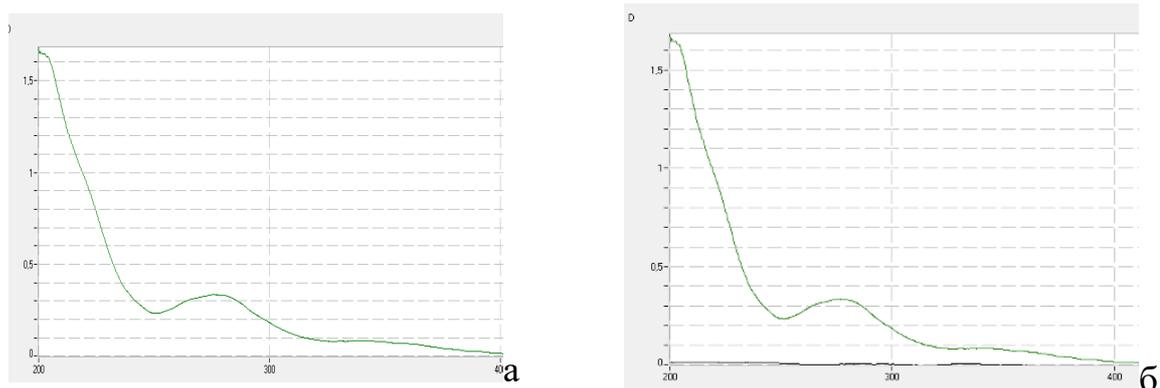


Рисунок 45 - УФ-спектры СО ГК (а) и испытуемого раствора с боратным буфером (б): зеленый цвет- испытуемый раствор; черный- боратный буфер

Рисунок 45 демонстрирует доказательство специфичности методики, поскольку соблюдаются критерии приемлемости, т. е. с ее помощью можно селективно определять ГК в извлечении фитокомпозиции.

Прецизионность (повторяемость, внутрилабораторная прецизионность). Оценку валидационного показателя «Повторяемость» осуществляли на 9 концентрациях извлечения, охватывающих диапазон применения методики (3 определения для 3 уровней концентраций - 80%, 100% и 120% от номинального содержания ГК в извлечении). Показатель «Внутрилабораторная прецизионность» оценивали в разные дни с применением двух видов приборов (спектрофотометры СФ-2000 ООО «ОКБ СПЕКТР», Россия и UV-1800 Shimadzu, Япония).

Результаты, полученные при статистической обработке, достоверны при $P=95\%$. Вычисленные значения среднего значения и относительного стандартного отклонения среднего результата ($S\bar{x},\%$) при оценке прецизионности методики количественного определения ГК приведены в таблице 37.

Таблица 37 - Результаты оценки прецизионности методики количественного определения ГК в ФК родиола четырехлепестная – ортилия однобокая

День 1						День 2					
80% (1)		100% (2)		120% (3)		80% (1)		100% (2)		120% (3)	
A	X, %	A	X, %	A	X, %	A	X, %	A	X, %	A	X, %
0,195	4,203	0,259	4,584	0,3152	5,039	0,192	4,154	0,259	4,603	0,315	5,032
0,195	4,235	0,256	4,550	0,3165	5,046	0,194	4,198	0,257	4,577	0,314	4,992
0,193	4,169	0,252	4,502	0,3177	5,090	0,194	4,206	0,256	4,511	0,318	5,041
Метрологические характеристики											
		\bar{X}	S	$S\bar{x}$	$S\bar{x}, \%$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\epsilon}, \%$	$t_{расч}$	$F_{расч}$		
Уровень 1	День 1	4,202	0,033	0,019	0,46	0,082	1,96	0,45	1,29		
	День 2	4,186	0,029	0,016	0,39	0,070	1,67				
Уровень 2	День 1	4,545	0,047	0,027	0,59	0,113	2,49	0,38	1,31		
	День 2	4,564	0,041	0,024	0,52	0,099	2,19				
Уровень 3	День 1	4,978	0,028	0,016	0,31	0,067	1,32	0,77	1,16		
	День 2	4,954	0,026	0,015	0,30	0,063	1,24				

Из данных таблицы следует, что результаты относительного стандартного отклонения среднего результата не превышают критериев приемлемости ($S\bar{x}, \%$ не более 2% и относительный доверительный интервал среднего значения не более 5%), также критерии Фишера $F_{расч} < F_{табл}$ ($p=0,05$) ($F_{табл} = 9,28$), критерии Стьюдента $t_{расч} < t_{табл}$ ($P=95\%$) ($t_{табл} = 4,30$), что свидетельствует о прецизионности методики.

Линейность. Валидационный параметр «линейность» оценивали путем приготовления растворов извлечения 6 уровней концентраций СО ГК в диапазоне от 70 до 120 % (от количества ГК в извлечении ФК, принятого за 100%) и проводили их оценку. График зависимости оптической плотности от содержания ГК имеет линейный характер (рисунок 46). Критерием приемлемости параметра «Линейность» является коэффициент корреляции (r), который должен быть не ниже 0,995. Коэффициент корреляции в эксперименте составил 0,9980, следовательно, данную методику можно использовать для определения ГК в ФК в указанном диапазоне концентраций.

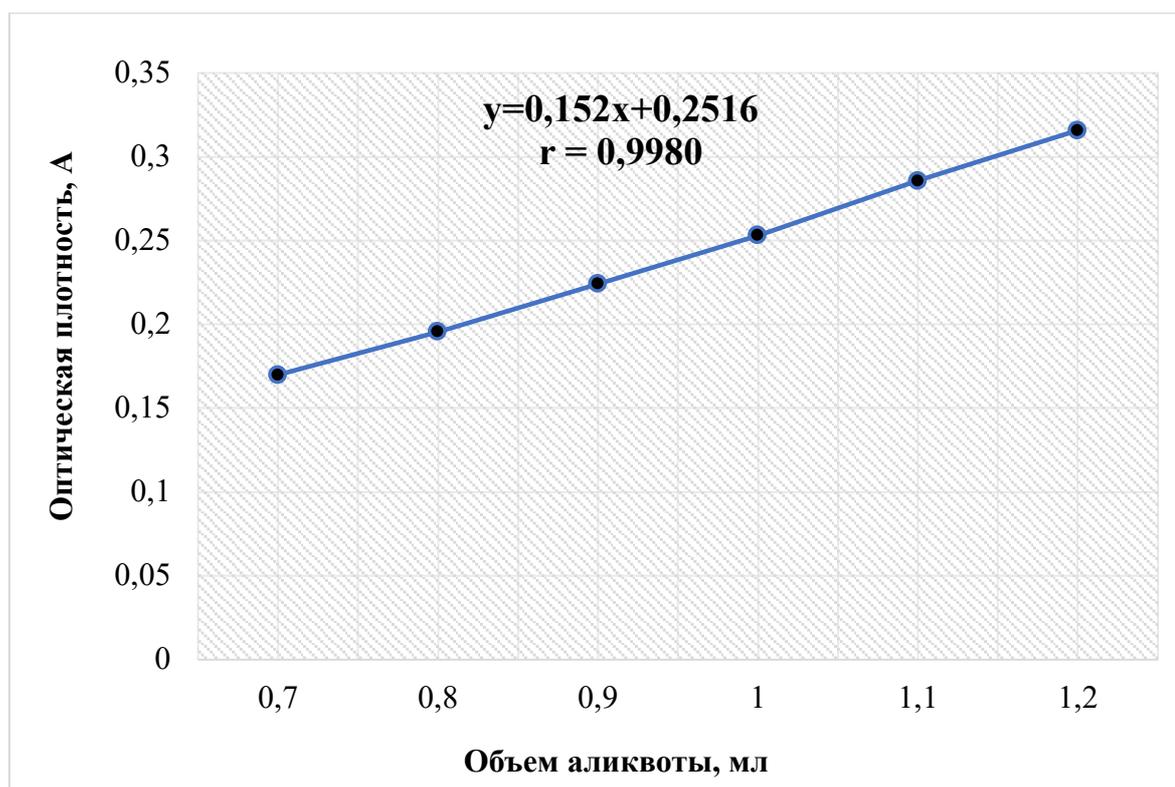


Рисунок 46 - График линейной зависимости оптической плотности от содержания ГК в СО

Правильность. Правильность методики устанавливали методом добавок на образцах с концентрацией 80%, 100% и 120% добавлением известного количества СО ГК к исследуемым извлечениям из ФК. Испытания 3-х образцов (с индивидуальной пробоподготовкой) проводили трижды. Результаты оценки параметра «Правильность» приведены в таблице 38.

Средняя величина процента восстановления полученного содержания ГК при использовании растворов заданных концентраций, должна находиться в пределах $100 \pm 5\%$. В применяемой методике процент восстановления находится в пределах 98,2–99,2% при оценке правильности методики количественного определения ГК. Результаты достоверны при $P = 95\%$, вычисленные значения $S\bar{x}, \%$ составили не более 2%.

Таблица 38 – Результаты оценки показателя «Правильность»

Образцы	C = 80%			C=100%			C=120%		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Оптическая плотность, А	0,192	0,194	0,194	0,259	0,256	0,252	0,315	0,317	0,318
Рассчитанное содержание ГК, г	0,216	0,214	0,217	0,258	0,252	0,253	0,309	0,308	0,308
Добавлено СО ГК, г	0,064	0,064	0,064	0,064	0,064	0,064	0,064	0,064	0,064
Содержание ГК (ожидаемое), г	0,280	0,278	0,281	0,322	0,316	0,317	0,373	0,372	0,372
Оптическая плотность, А _г	0,241	0,239	0,229	0,324	0,321	0,328	0,394	0,385	0,388
Содержание ГК (полученное), г	0,274	0,275	0,277	0,313	0,315	0,313	0,365	0,365	0,367
% восстановления	97,8	98,9	98,6	99,2	99,6	98,8	97,9	98,1	98,7
Метрологические характеристики									
C = 80%									
\bar{X}	S	$S\bar{x}$	$S\bar{x}, \%$	P, %	t (P, f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}, \%$		
98,4	0,57	0,33	0,33	95	2,31	0,76	0,77		
C=100%									
\bar{X}	S	$S\bar{x}$	$S\bar{x}, \%$	P, %	t (P, f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}, \%$		
99,2	0,40	0,23	0,25	95	2,31	0,53	0,54		
C=120%									
\bar{X}	S	$S\bar{x}$	$S\bar{x}, \%$	P, %	t (P, f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}, \%$		
98,2	0,42	0,24	0,25	95	2,31	0,56	0,58		

Устойчивость. При изучении устойчивости анализировали влияние температуры хранения и времени хранения извлечения на результаты содержания ГК в сборе (таблица 39).

Таблица 39 – Результаты изучения устойчивости аналитической методики определения ГК в ФК

Время	Оптическая плотность / содержание ГК	t = 20°C	t= 5-8°C
1	2	3	4
11:00	A	0,289 0,288 0,289	
	Содержание ГК среднее, %	4,81	
Метрологические характеристики: $\bar{X} = 4,81; S\bar{x} = 0,001; S\bar{x}, \% = 0,08 \Delta\bar{x} = 0,001; \bar{\varepsilon}, \% = 0,02$			
15:00	A	0,268 0,265 0,269	0,245 0,240 0,243
	Содержание ГК среднее, %	4,53	3,77

Продолжение таблицы 39

1	2	3	4
Метрологические характеристики: $\bar{X} = 4,53; S\bar{x} = 0,003; S\bar{x},\% = 0,06 \Delta\bar{x} = 0,002; \bar{\varepsilon},\% = 0,05$			
19:00	А	0,224 0,221 0,223	0,183 0,179 0,185
	Содержание ГК среднее, %	3,64	2,90
Метрологические характеристики: $\bar{X} = 3,64; S\bar{x} = 0,001; S\bar{x},\% = 0,04; \Delta\bar{x} = 0,001, \bar{\varepsilon},\% = 0,04$			

Исходя из данных, представленных в таблице 39, можно сделать заключение, что на количество ГК в извлечении влияют такие факторы как температура и время. Так, при комнатной температуре за 4 часа содержание ГК изменяется незначительно (уменьшается на 0,28%), в то время как за 8 часов (что соответствует критерию «свежеприготовленный») содержание уменьшается практически на 1,5%. Кроме того, на содержание ГК в испытуемом растворе отрицательно сказывается пониженная температура хранения. Так, за 8 часов хранения при температуре 5-8°C содержание ГК уменьшается практически вдвое. Это может быть связано с осаждением и/или полимеризацией ГК в результате пониженной температуры. Следовательно, можно заключить, что испытуемые растворы необходимо анализировать сразу после приготовления.

В результате проведения валидационных испытаний можно сделать вывод, что методика УФ-СФМ количественного определения ГК дает приемлемые результаты, удовлетворяет установленным требованиям и является пригодной для использования в аналитических лабораториях.

6.2. Стандартизация растительного сбора из сырья родиолы четырёхлепестной и ортилии однобокой

6.2.1. Числовые показатели

Числовые показатели растительного сбора были определены в соответствии с методикой, представленной в пункте 2.2.1.2.

Результаты представлены в таблице 40.

Таблица 40 – Числовые фармакопейные показатели растительного сбора

Серия	Зола общая, %	Зола нерастворимая в 10% растворе HCl, %	Влажность, %
061121	5,36	1,97	7,53
230621	4,00	0,76	7,66
150821	4,03	0,86	7,70
190921	4,15	0,94	7,49
350521	4,07	0,81	7,64
110621	4,11	0,88	7,58
$\bar{X} \pm \Delta x$	4,29 \pm 0,42	1,04 \pm 0,51	7,6 \pm 0,1

В качестве критерия «доброкачественность» для стандартизации лекарственного сбора нормируются следующие показатели: зола общая - не более 10%, зола нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты - не более 3%, влажность - не более 10%.

Показатель «посторонние примеси» для сбора представляет собой другие части растения (для родиолы четырехлепестной), стебли и листья изменившие окраску (для ортилии однобокой), сырье других видов рода *Rhodiola*, органические и минеральные примеси. Результаты изучения посторонних примесей представлены в таблице 41.

Таблица 41- Экспериментальные и рекомендуемые нормы показателя «посторонние примеси» для растительного сбора

Посторонние примеси	Экспериментальные данные	Рекомендуемые нормы для проекта НД
Другие части растения (стебли, листья)	1,82 \pm 0,23%	не более 5%
Сырье, изменившее окраску (пожелтевшее и почерневшее)	6,5 \pm 0,33%	Не более 10%
Сырье других видов рода <i>Rhodiola</i>	0,9 \pm 0,11%	не более 1%
Органическая примесь	1,5 \pm 0,37%	не более 3%
Минеральная примесь	1,92 \pm 0,43%	не более 5%

Результаты определения суммы экстрактивных веществ представлены в таблице 42.

Таблица 42 - Результаты определения показателя «сумма экстрактивных веществ»

Серия	Растворитель		
	Вода очищенная	спирт 40%	спирт 70%
061121	7,93%	6,51%	6,81%
230621	7,88%	6,35%	6,88%
150821	7,91%	6,71%	6,33%
190921	7,85%	6,27%	6,43%
350521	7,89%	6,39%	6,80%
110621	7,91%	6,38%	6,11%
$\bar{X} \pm \Delta x$	$7,90 \pm 0,01\%$	$6,44 \pm 0,02\%$	$6,56 \pm 0,02\%$

Из данных таблицы 42 следует, что максимальное количество экстрактивных веществ извлекается водой – 7,9%. Наименьший выход экстрактивных веществ наблюдался при использовании в качестве экстрагента спирта 40%–6,44%. Предложено включить в проект НД показатель содержания экстрактивных веществ на уровне не менее 7,0% при использовании в качестве экстрагента воды очищенной.

Результаты изучения степени измельченности сбора представлены в таблице 43.

Таблица 43 - Степень измельченности растительного сбора из родиолы четырехлепестной и ортилии однобокой

Размер частиц	Сбор, %
Больше 7 мм	$2,4 \pm 0,1$
От 5 до 7 мм	$12,5 \pm 0,3$
От 3 до 5 мм	$71,1 \pm 0,3$
От 0,5 до 3 мм	$10,2 \pm 0,4$
Меньше 0,5 мм	$3,8 \pm 0,3$

Исходя из данных таблицы 43, можно рекомендовать следующие нормы измельченности: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм не более 3%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм не более 5%.

6.2.2. Технологические параметры сбора

Результаты изучения технологических параметров ФК представлены в таблице 44.

Таблица 44 – технологические параметры ФК

Серия	Насыпная масса, г/см ³	Удельная масса, г/см ³	Объемная масса, г/см ³	Порозность, г/см ³	Пористость, г/см ³	Свободный объем слоя сырья, г/см ³
061121	0,1981	1,3181	0,6931	0,7141	0,4742	0,8497
230621	0,1945	1,3194	0,6933	0,7195	0,4745	0,8523
150821	0,1957	1,3182	0,6910	0,7168	0,4758	0,8515
190921	0,1990	1,3124	0,6927	0,7127	0,4722	0,8484
350521	0,1988	1,3172	0,6929	0,7131	0,4740	0,8491
110621	0,1983	1,3200	0,6919	0,7134	0,4758	0,8498
$\bar{X} \pm \Delta x$	0,1974 $\pm 0,0007$	1,3176 $\pm 0,001$	0,6925 $\pm 0,0003$	0,7149 $\pm 0,001$	0,4744 $\pm 0,0005$	0,8502 $\pm 0,0006$
Коэффициенты поглощения экстрагента						
Экстрагент	V (мл)		V ₁ (мл)	P (г)	$\bar{X} \pm \Delta x$ (мл / г)	
Вода очищенная	70		54	5,1601	3,1 \pm 0,03	
Спирт 40%	70		58	5,1932	2,31 \pm 0,02	
Спирт 70%	46		36	5,0384	1,99 \pm 0,02	
Спирт 96%	60		51	5,0512	1,79 \pm 0,01	

Для определения КПЭ брали исходный объем растворителя в тех же значениях, что и для сырья родиолы четырехлепестной с целью прослеживания динамики. Из таблицы 46 следует, что вода очищенная наиболее всего поглощается сырьем, а менее всего – спирт 96%. Также установлены значения насыпной, удельной и объемной массы, пористость, порозность и свободный объем слоя. Все эти показатели необходимы для дальнейшей разработки ЛП на основе фитокомпозиции.

6.2.3. Макро- и микроскопический анализ растительной композиции

Для разработки проекта НД на сбор необходимо было установить его характерные макро- и микроскопические признаки. Анализ проводили в соответствии с методиками указанными в пункте 2.2.1.1.

Макроскопический анализ.

Рисунок 46 – внешний вид сбора

Сбор представляет собой смесь неоднородных частиц растительного сырья (рис. 46) красно-коричневого цвета со светло-зелеными и темно-зелеными вкраплениями, измельченных до размера 7 мм.

При исследовании с помощью лупы (x10) видны кусочки корневищ и корней различной формы, как правило, морщинистые, со следами отмерших стеблей. Поверхность матовая, темно-коричневого цвета, на изломе красно-коричневого цвета (корневища и корни родиолы четырехлепестной). Кусочки листьев, иногда с пильчатым краем, голых, темно-зеленых с одной стороны и светло-зеленых с другой, жилкование перисто-сетчатое, главная жилка выступает с нижней стороны листа. Запах слабый. Вкус водного извлечения вязущий.

Микроскопические признаки. Характерно наличие признаков для отдельных элементов (листья, стебли, кора, корневище), указанных в главе 5 для сырья ортилии однобокой (5.1.1) и родиолы четырехлепестной (5.2.1).

6.2.4. Разработка проекта НД на сбор

В результате проведенных исследований растительной композиции, были выделены критерии для ее стандартизации с целью дальнейшей разработки ЛП на ее основе. Проект НД на «Сбор гинекологический № 1» представлен в приложении Г.

Выводы к главе 6

1. По результатам фитохимического исследования растительных композиций в трех вариантах соотношений видов сырья родиолы четырехлепестной и ортилии однобокой было определено оптимальное соотношение компонентов – 2:1, соответственно. Водное извлечение указанной ФК содержит салидрозида – 0,53%, ГК – 4,22%. Данные компоненты были установлены как целевые при стандартизации композиции.

2. Адаптирована УФ-СФМ методика количественного определения ГК для растительного сбора. Проведена оценка ее валидационных параметров в результате чего установлено, что данная методика дает воспроизводимые результаты и пригодна для использования в аналитических лабораториях.

3. Для фитокомпозиции из сырья родиолы четырехлепестной и ортилии однобокой 2:1 определены числовые показатели, технологические параметры, а также установлены характерные макро- и микроскопические признаки.

4. Разработан проект НД на растительную композицию «Сбор гинекологический №1».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Критический анализ массива научных данных в отношении степени изученности *Orthilia secunda* L. и *Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. & C.A.Mey., а также данные о количестве БАД на основе сырья этих растений позволили установить отсутствие системного фитохимического профилирования и стандартизации, а с учетом популярности этих видов в этнофармакологии гинекологических патологий обосновать актуальность и сформулировать дизайн исследования.

1. Проведен системный фитохимический скрининг сырья ортилии и родиолы четырехлепестной. С помощью групповых качественных реакций и хроматографических методов (ТСХ и ВЭТСХ) в сырье ортилии однобокой установлено наличие углеводов, аминокислот, терпеновых соединений, дубильных веществ, 4 органических кислот, 5 флавоноидов, 3 ГКК и 3 ФКК, установлено наличие арбутина. Показано, что накопление указанных соединений варьируемо и зависит от зоны произрастания растения. Максимальным ассортиментом отдельных БАВ отличалась трава ортилии, заготовленная в Пермском крае. В сырье родиолы четырехлепестной установлена 1 органическая кислота, 2 аминокислоты, 3 флавоноида, 7 веществ терпеновой структуры, 3 ГКК, 1 ФКК, а также идентифицированы салидрозид и тирозол - специфичные фенольные соединения, характерные для растений рода *Rhodiola*. Проведенные исследования позволили выбрать маркерные группы БАВ – полифенольные соединения (в т.ч. галловая кислота и арбутин) для ортилии однобокой и родоспецифичные фенольные спирты для родиолы четырехлепестной – для стандартизации объектов исследования.

2. Методом ВЭЖХ изучен профиль и проведена количественная оценка содержания родоспецифичных фенольных соединений в сырье 3 видов родиол в сравнительном аспекте. На основе экспериментальных данных показано, что производные коричных спиртов – розавин, розиридол и др. – являются видоспецифичными и накапливаются только в родиоле розовой.

Мажоритарными компонентами для сырья р. четырехлепестной являются салидрозид и тирозол (0,53% и 0,21% соответственно), которые выбраны в качестве маркерных для стандартизации сырья.

3. Изучен макро- и микроэлементный состав растений – объектов исследования. К элементам максимального накопления можно отнести: железо $127 \pm 6,0$ мг/кг, марганец $329 \pm 29,0$ мг/кг, цинк $20,80 \pm 0,2$ мг/кг (для ортилии однобокой); железо $628,0 \pm 62,0$ мг/кг, медь $3,8 \pm 0,09$ мг/кг и марганец $52,0 \pm 7,0$ мг/кг (для родиолы четырехлепестной). Установлено, что место произрастания растений не влияет на качественные и количественные характеристики элементного профиля. В результате исследования установлены видовые отличия в минеральном профиле растений рода *Rhodiola*. Так, в родиоле четырёхлепестной установлена высокая концентрация натрия и марганца, причем содержание марганца в 3 раза больше, чем в р. розовой, и в 4,9 раз больше, чем в р. разнозубчатой. Отмечено высокое содержание марганца ($329 \pm 29,0$ мг/кг) в траве ортилии однобокой по сравнению с сырьем 3 видов родиол. Следовательно, ортилия однобокая, наряду с родиолами, относится к манганофилам и может служить индикатором почв, богатых солями данного элемента

4. Из корневищ с корнями *Rhodiola quadrifida* выделены в индивидуальном состоянии и идентифицированы методами ЯМР и масс-спектрометрии 7 компонентов этилацетатной фракции – протокатеховая кислота, 4-гидроксибензойная кислота, кофейная кислота, этилгаллат, катехин и эпикатехин, тирозол. Данные БАВ являются мажоритарными для сырья родиолы четырехлепестной, что позволяет использовать их как отдельный элемент стандартизации. Методом ГХ-МС в гексановой фракции сырья родиолы четырехлепестной установлено наличие 22 соединений, 17 из которых были идентифицированы и оценены количественно методом внутренней нормализации. Максимально представлены эфиры жирных кислот (этиловый эфир пальмитиновой кислоты - 16,9%; этиловый эфир линолевой кислоты – 32,67%; этиловый эфир олеиновой кислоты – 16,9%). Показано

отсутствие среди идентифицированных соединений веществ терпеновой природы, что косвенно говорит об отсутствии эфирного масла в родиоле четырехлепестной или накоплении терпеновых соединений в минимальном количестве, что отличает данный вид сырья от фармакопейного – родиолы розовой. Для выделенных соединений проведена прогностическая оценка фармакологической активности с помощью программы PASS и показана перспективность разработки фитопрепаратов гинекологической направленности ввиду способности мажоритарных соединений ингибировать тестостерон 17 β -дегидрогеназу (НАДФ+).

5. На основе проведенных исследований выбраны критерии стандартизации, установлено их нормирование и предложены методики оценки подлинности и доброкачественности травы ортилии однобокой и корневищ с корнями родиолы розовой. Для родиолы в качестве критерия «Подлинность» предложены макро- и микроскопические диагностические признаки (многорядная слоистая пробка, состоящая из суберинизированных клеток, вытянутых в длину, непучковый тип строения, флоэма частично разрушенная, сердцевина выполнена) и испытания методом ТСХ (идентификация салидрозида и тирозола), установлены числовые показатели (зола общая и зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, влажность, посторонние примеси, сумма экстрактивных веществ). Количественную оценку качества сырья рекомендовано проводить по содержанию салидрозида – не менее 0,5% и тирозола – не менее 0,2% методом ВЭЖХ.

Для показателя «Подлинность» травы ортилии однобокой предложены макро- и микроскопические диагностические признаки (клеточные стенки эпидермиса четковидно утолщенные, гипостоматический тип листа, устьичный аппарат аномоцитного типа, в мезофилле нет деления на палисадную и губчатую ткань, стебель непучкового типа строения) и испытания методом ТСХ (идентификация галловой кислоты), также установлены числовые показатели (аналогичны родиоле четырехлепестной). Качество сырья по показателю «Количественное определение» рекомендовано

проводить по содержанию галловой кислоты – не менее 6,0% методом УФ-СФМ.

Для объектов исследования изучены технологические параметры. Установленные критерии качества нашли отражение в проектах фармакопейных статей «Ортилии однобокой трава», «Родиолы четырехлепестной корневища и корни».

6. Предложен оптимальный состав фитосубстанции (растительного сбора) на основе сырья ортилии однобокой и родиолы четырехлепестной и установлены критерии его стандартизации. Проведена валидационная оценка методики количественного определения ГК методом УФ-СФМ и верификационная оценка (по параметру «специфичность») методики количественного определения салидрозида и тирозола методом ВЭЖХ. Пул экспериментальных данных показал, что предложенные методики дают воспроизводимые и достоверные результаты и могут быть использованы для целей контроля качества растительного сбора. На основе проведенных исследований разработан проект НД «Сбор гинекологический № 1».

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АЭС - атомно-эмиссионная спектрофотометрия
- БАВ - биологически активные вещества
- БАД - биологически активные добавки
- БИН РАН - Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук
- БУВ - н-бутанол – уксусная кислота ледяная – вода
- БФ – бутанольная фракция
- ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения
- ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография
- ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография
- ВФ – водная фракция
- ГКК - гидроксикоричная кислота
- ГК – галловая кислота
- ГФ – гексановая фракция
- ГФ РФ XIV- Государственная фармакопея Российской Федерации XIV
- ГХ - газовая хроматография
- ГХ-МС - газовая хроматография—масс-спектрометрия
- ЕФ – Европейская фармакопея 10.0 издания
- КПЭ - коэффициент поглощения экстрагента
- ЛП – лекарственный препарат
- ЛР - лекарственное растение
- ЛРС - лекарственное растительное сырье
- НД - нормативная документация
- НР – нежелательные реакции
- ПО - программное обеспечение
- ПФ – подвижная фаза
- ПФС- полифенольные соединения
- СО - стандартный образец
- ТСХ - тонкослойная хроматография

УФ - ультрафиолетовое излучение

УФ-СФМ – спектрофотометрия в ультрафиолетовой области

ФКК - фенолкарбоновая кислота

ФС – фармакопейная статья

ЭФ- этилацетатная фракция

ЯМР – ядроно – магнитный резонанс

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Зязева, Н. Н. Современное состояние, условия и перспективы развития мирового фармацевтического рынка/ Н.Н. Зязева // Российский внешнеэкономический вестник. - 2015. - №12.- С.118-129.
2. Lin, A.A. The field of pharmaceuticals is the most high-technology part of world economy /A.A. Lin, V. Goncharov, E.A. Ivichev // SEI GESUND. - 2016.- №1.- P. 23-25.
3. George, A. In vitro and ex-vivo cellular antioxidant protection and cognitive enhancing effects of an extract of *Polygonum minus* Huds (Lineminus™) demonstrated in a Barnes Maze animal model for memory and learning/ A. George, C.P. Ng, M. O'Callaghan, et al. // BMC Complement Altern Med. -2014. - №14(161). DOI:10.1186/1472-6882-14-161
4. Sompong, W. Inhibitory effect of herbal medicines and their trapping abilities against methylglyoxal-derived advanced glycation end-products/ W. Sompong, S. Adisakwattana, // BMC Complement Altern Med. -2015. – №15(394). DOI:10.1186/s12906-015-0897-8
5. Буркова, Е.А. Перспектива применения фитобиотехнологии для получения биологически активных веществ/ Е.А. Буркова, А.В. Канарский, З.А. Канарская // Вестник Казанского технологического университета. - 2014.- №14. - С. 352-356.
6. Токтоналиев, И. У. Фармакоэпидемиологическое изучение использования фитопрепаратов в кыргызской республике и маркетинговая оценка: автореф. на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук/ И. У. Токтоналиев– Бишкек -2019. 23 с.
7. Тернинко, И.И. О состоянии изучения ортилии однобокой и родиолы четырехлепестной для терапии гинекологических заболеваний/ И.И. Тернинко, А.В. Лёзина, Н. А. Снигирева, М. А. Романова // Инновации в здоровье нации. Сборник материалов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. 2019. С. 387–390.

8. Ботоева, Е. А. Химическое и фармакологическое исследование ортилии однобокой *Orthilia secunda* (L.) house/ Е. А. Ботоева, С. С. Аомбоева, А. Б. Бураева, С. А. Чукаев // Сиб. мед. журн. (Иркутск). - 2003.- №1.- С. 69 - 72.

9. Khokhlova, K. Authentication of *Rhodiola rosea*, *Rhodiola quadrifida* and *Rhodiola rosea* liquid extract from the Ukrainian market using HPTLC chromatographic profiles / K. Khokhlova, O. Zdoryk // Nat Prod Res. – 2020. - №34(19). - P.2842-2846. DOI:10.1080/14786419.2019.1591398.

10. Yoshikawa, M. Bioactive constituents of Chinese natural medicines. I. New sesquiterpene ketones with vasorelaxant effect from Chinese moxa, the processed leaves of *Artemisia argyi* Levl. et Vant.: moxartenone and moxartenolide/ M. Yoshikawa, H. Shimada, H. Matsuda, J. Yamahara, N. Murakami // Chem Pharm Bull (Tokyo). – 1996. -№ 44(9). - P.656-62.DOI:10.1248/cpb.44.1656.

11. Ломбоева, С.С. Фармакогностическая характеристика *Orthilia secunda* (L.) House и разработка на ее основе лекарственной формы: автореф. на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук/ Ломбоева Светлана Сергеевна – Улан-Удэ -2005. 24 с.

12. Лёзина, А.В. Получение и предварительный анализ отдельных фракций сырья *Rhodiola. quadrifida*/ А.В. Лёзина, И.И. Тернинко// Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы. Международная научнопрактическая конференция: сборник материалов – Томск: Изд-во СибГМУ, 2021. С. 53-55.

13. Noreen, E. The effects of an acute dose of *Rhodiola rosea* on exercise performance and cognitive function/ E. Noreen, J. Buckley, S. Lewis // J Int Soc Sports Nutr. - 2009. – №6. DOI:10.1186/1550-2783-6-S1-P14

14. Roumanille, R. Acute and chronic effects of *Rhaponticum carthamoides* and *Rhodiola rosea* extracts supplementation coupled to resistance exercise on muscle protein synthesis and mechanical power in rats/ R. Roumanille, B. Vernus, T. Brioche, et al. // J Int Soc Sports Nutr. – 2020.- № 17. DOI:10.1186/s12970-020-00390-5

15. Ishaque, S. *Rhodiola rosea* for physical and mental fatigue: a systematic review/ S. Ishaque, L. Shamseer, C. Bukutu, et al. // BMC Complement Altern Med. – 2012. - №12. DOI:10.1186/1472-6882-12-70

16. Labachyan, K.E. The impact of *Rhodiola rosea* on the gut microbial community of *Drosophila melanogaster*/ K.E. Labachyan, D. Kiani, E.A. Sevrioukov, et al. // Gut Pathog. – 2018. - №10. DOI:10.1186/s13099-018-0239-8

17. Niu, C. S. Antihyperglycemic action of rhodiola-aqueous extract in type1-like diabetic rats/ C. S. Niu, L.J. Chen, H.S. Niu // BMC Complement Altern Med. – 2014.- №14. DOI:10.1186/1472-6882-14-20

18. You, L. Salidroside protects endothelial cells against LPS-induced inflammatory injury by inhibiting NLRP3 and enhancing autophagy/ L. You, D. Zhang, H. Geng et al.// BMC Complement Med Ther. – 2021.- №21. DOI:10.1186/s12906-021-03307-0

19. Sellami, M. Herbal medicine for sports: a review/ M.Sellami, O. Slimeni, A. Pokrywka et al. // J Int Soc Sports Nutr. -2018. - №15. DOI:10.1186/s12970-018-0218-y

20. Spalek, K. Historical ethnopharmacology of the herbalists from Krummhübel in the Sudety Mountains (seventeenth to nineteenth century) Silesia./ K. Spalek, I. Spielvogel, M. Proćków // J Ethnobiology Ethnomedicine – 2019. - №15. DOI:10.1186/s13002-019-0298-z

21. Helmstädter, A. Traditional use of medicinal agents: a valid source of evidence./ A. Helmstädter, C. Staiger // Drug Discov Today.–2014. -№19.–P.4-7.

22. Staub, P.O. Back to the roots: a quantitative survey of herbal drugs in Dioscorides' De Materia Medica (ex Matthioli, 1568)/ P. Staub, L. Casu, M. Leonti // Phytomedicine. – 2016. - №23. – P.1043–52.

23. Petrovska, B.B. Historical review of medicinal plants' usage/ B.B. Petrovska// Pharmacogn Rev. – 2012. - №6(11). - P.1-5. DOI:10.4103/0973-7847.95849

24. Obakiro, S.B. Ethnobotany, ethnopharmacology, and phytochemistry of traditional medicinal plants used in the management of symptoms of tuberculosis in

East Africa: a systematic review/ S.B. Obakiro, A. Kiprop, I. Kowino//Trop Med Health. – 2020. - №48. DOI:10.1186/s41182-020-00256-1

25. Schultz, F. Ethnobotanical study of selected medicinal plants traditionally used in the rural Greater Mpigi region of Uganda/ F. Schultz, G. Anywar, B. Wack, C.L. Quave CL, L. A. Garbe// J Ethnopharmacol. – 2020. - №256. DOI:10.1016/j.jep.2020.112742

26. Milugo, T.K. Antagonistic effect of alkaloids and saponins on bioactivity in the quinine tree (*Rauvolfia caffra sond.*): further evidence to support biotechnology in traditional medicinal plants/ T.K. Milugo, L.K. Omosa, J.O. Ochanda// BMC Complement Altern Med. – 2013. -№13. DOI:10.1186/1472-6882-13-285

27. Sun, Z.K. Traditional Chinese medicine: a promising candidate for the treatment of Alzheimer's disease/ Z.K. Sun, H. Q. Yang, S.D. Chen// Transl Neurodegener. – 2013. -№ 2. DOI:10.1186/2047-9158-2-6

28. Newman, D. J. Natural products as sources of new drugs ver the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019/ D. J. Newman, G. M. Cragg // Journal of natural products. – 2020. – Vol. 83. – №. 3. – P. 770–803. DOI:10.1021/acs.jnatprod.9b01285

29. Marques, A. Ethnopharmacological investigation of the cardiovascular effects of the ethanol-soluble fraction of *Aloysia polystachya* (Griseb.) Moldenke leaves in spontaneously hypertensive rats/ A. Marques, B. Lorençone, P. Romão, et al.// J Ethnopharmacol. – 2021. - №274. DOI: 10.1016/j.jep.2021.114077

30. Soós, S.Á. Herbal medicine use by surgery patients in Hungary: a descriptive study/S.A. Soós, N. Jeszenői, K. Darvas, et al.// BMC Complement Altern Med. – 2015. - №15. DOI:10.1186/s12906-015-0890-2

31. What's NEXT, электронный информационный бюллетень 18.09.2020 [Электронный ресурс]. – URL:<https://www.whatsnextinnatural.com/> (дата обращения: 20.05.2022).

32. Amaral, P. Regulation of non-conventional therapies in Portugal: lessons learnt for strengthening human resources in health/P. Amaral, I. Fronteira // Hum Resour Health. – 2021. - №19. DOI:10.1186/s12960-021-00655-3

33. World Health Organization. WHO global report on traditional and complementary medicine 2019 [Internet]. World Health Organization; 2019 [Дата обращения 04.04.2022]. - URL: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/312342>

34. Акамова, А.В. Многовекторный маркетинговый анализ российского рынка фитопрепаратов/ А.В. Акамова, О.Д. Немятых, И.А. Наркевич// Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. - №4. – С.276-280.

35. Шубина, Д. Объем рынка фитопрепаратов за 5 лет вырастет до 35,4 млрд долларов. URL: <https://vademec.ru/> [Дата обращения 05.05.2022].

36. Белоусова, О. В. Биологически активные добавки как перспективное направление развития фармацевтического рынка/ О.В. Белоусова, Е.А. Белоусов, А.О. Иващенко // Научные результаты биомедицинских исследований. - 2016. - №4. – С.89-94. DOI:10.18413/2313-8955-2016-2-4-89-94

37. Квачахия, Л.Л. Состояние отечественного рынка биологически активных добавок/ Л.Л. Квачахия // Иннов: электронный научный журнал. – 2018. - №2. – С.48-55.

38. Cravotto, G. Phytotherapeutics: an evaluation of the potential of 1000 plants/ G. Cravotto, L. Boffa, L. Genzini, D. Garella D.// J Clin Pharm Ther. – 2010. - №35. – P. 11-48. DOI: 10.1111/j.1365-2710.2009.01096.x

39. DSM Group. Отчеты. БАД в фокусе роста. [Электронный ресурс]. URL: https://dsm.ru/news-reports/?PAGEN_2=2 [Дата обращения 11.05.2022].

40. Катрен стиль. Онлайн журнал для фармацевтов и медицинских работников. – 2021. - №215. [Электронный ресурс]. URL: https://www.katrenstyle.ru/news/obzor_rynka_bad_kazhdyy_rossiyanin_v_srednem_okuupaet_dve_upakovki_v_god [Дата обращения 11.05.2022].

41. Solgar: [Электронный ресурс]. URL: <https://solgarvitamin.ru/> [Дата обращения 12.05.2022].

42. Эвалар. [Электронный ресурс]. URL: <https://shop.evalar.ru/> [Дата обращения 12.05.2022].

43. Segal, T.R. Before the beginning: environmental exposures and reproductive and obstetrical outcomes/ T.R. Segal, L.C. Giudice // *Fertility and Sterility*- 2019. - №112(4). - P. 613-621.

44. World Health Organization. Global health estimates 2015: deaths by cause, age, sex, by country and by region, 2000-2015. Geneva, 2016.

45. World Health Organization. International Classification of Diseases, 11th Revision (ICD-11) Geneva: WHO 2018.

46. Ferlay, J. Cancer statistics for the year 2020: An overview/ J. Ferlay, M. Colombet, I. Soerjomataram et al. // *Int J Cancer*. - 2021.

47. Петрова, Г.В. Состояние диагностики злокачественных новообразований в России/Г.В. Петрова, В.В. Старинский, Н.В. Харченко, О.П. Грецова // VII съезд онкологов России - сборник материалов. Часть 2. – 2008. - С. 31-72.

48. Global Health Estimates 2019: Deaths by Cause, Age, Sex, by Country and by Region, 2000-2019. Geneva, World Health Organization; 2020.

49. Brüggmann, D. Endometriosis and its global research architecture: an in-depth density-equalizing mapping analysis/ D. Brüggmann, A. Elizabeth-Martinez, D. Klingelhöfer et al. // *BMC Women's Health*. – 2016. - №16. DOI:10.1186/s12905-016-0336-0

50. O'Hara, R. Self-management in condition-specific health: a systematic review of the evidence among women diagnosed with endometriosis / R. O'Hara, H. Rowe, J. Fisher// *BMC Women's Health*. – 2019. -№19. DOI:10.1186/s12905-019-0774-6

51. Радецкая, Л.Е. Эндометриоз: современные принципы диагностики и лечения (обзор литературы). Часть 1. Терапия/Л.Е. Радецкая, Дейкало Н.С. // *Вестник ВГМУ*. - 2019. - №6. - С. 18-21.

52. Della Corte, L. Phytotherapy in endometriosis: an up-to-date review/L. Della Corte, M. Noventa, M. Ciebiera, M. Magliarditi, Z. Sleiman, E. Karaman, U.

Catena, C. Salvaggio, G. Falzone, S. Garzon // J Complement Integr Med.- 2020. - №23. DOI:10.1515/jcim-2019-0084. PMID: 31532753.

53. Гришкина, А. А. ЭНДОМЕТРИОЗ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ/ А. А. Гришкина, Н.В. Башмакова, Г.Н. Чистякова, И.И. Ремизова, О.А. Мелкозерова // Вестник СурГУ. Медицина. - 2020. - №3 (45). - С. 8-13.

54. Simms, I. Pelvic inflammatory disease epidemiology: what do we know and what do we need to know?/ I. Simms, J.M. Stephenson //Sexually Transmitted Infections. – 2000. - №76. - P.80-87.

55. Oakeshott, P. Community-based trial of screening for *Chlamydia trachomatis* to prevent pelvic inflammatory disease: the POPI (prevention of pelvic infection) trial/ P. Oakeshott, S. Kerry, H. Atherton et al.//Trials. – 2008. -№9. DOI:10.1186/1745-6215-9-73

56. Park, ST. Clinical characteristics of genital chlamydia infection in pelvic inflammatory disease/ ST. Park, SW. Lee, MJ. Kim, YM. Kang, HM. Moon, CC. Rhim // BMC Womens Health. – 2017. - №17. DOI:10.1186/s12905-016-0356-9.

57. Liang, Y. Acupuncture for chronic pelvic inflammatory disease: a qualitative study of patients' insistence on treatment/ Y. Liang, D. Gong// BMC Complement Altern Med. – 2014. - №14. DOI:10.1186/1472-6882-14-345

58. Savaris, R. Antibiotic therapy for pelvic inflammatory disease/ R. Savaris D. Fuhrich, R. Duarte, S. Franik, J. Ross// Cochrane Database Syst Rev. – 2017. - №4. DOI:10.1002/14651858.CD010285.pub2.

59. Клинические рекомендации «Рак молочной железы». Общероссийский национальный союз «Ассоциация онкологов России» - 2021.

60. Fisusi, F. Drug Combinations in Breast Cancer Therapy/ F. Fisusi, E. Akala// Pharm Nanotechnol. – 2019. - №7. – С.3-23. DOI:10.2174/2211738507666190122111224

61. Condorelli, R. Managing side effects in adjuvant endocrine therapy for breast cancer/ R. Condorelli, Vaz-Luis I. // Expert Rev Anticancer Ther. – 2018. - №18. - P.1101-1112. DOI:10.1080/14737140.2018.1520096

62. Taylor, C. Cardiac Side-effects From Breast Cancer Radiotherapy / C. Taylor, A. Kirby// Clin Oncol (R Coll Radiol). – 2015. - №27. - P.621-629. DOI:10.1016/j.clon.2015.06.007

63. Maughan, K. Treatment of breast cancer/ K. Maughan, M. Lutterbie, P. Ham //Am Fam Physician. – 2010. - №81. - P.1339-1346.

64. Tanbo, T. Endometriosis-associated infertility: aspects of pathophysiological mechanisms and treatment options. /Т. Tanbo, P. Fedorcsak //Acta Obstet Gynecol Scand. – 2017. - №96. – P.659-667. DOI:10.1111/aogs.13082

65. Самбукова, Т.В. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии/Т.В. Самбукова, Б.В. Овчинников, В.П. Гананольский, А.Н. Ятманов, П.Д. Шабанов// Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. - 2017. - №2. - С.56-63. DOI:10.17816/RCF15256-63

66. Хотим, Е. Н. Фитотерапия хронического пиелонефрита и фитопрофилактика его обострений/ Е.Н. Хотим, С. Н. Литвинович, А. Кумара, Б.О. Ал// Журнал Гродненского государственного медицинского университета. – 2014. - №3. – С.136-139.

67. Селимзянова, Л. Р. Фитотерапия: современное состояние вопроса/ Л.Р. Селимзянова, Е.А. Вишнёва, М.В. Федосеенко, Е.А. Промыслова //Педиатрическая фармакология. – 2016. - №13. – С.488–493. DOI: 10.15690/pf.v13i5.1645

68. Du, Y. Use of herbal medicinal products among children and adolescents in Germany/ ИК. Wolf, W. Zhuang, et al. // BMC Complement Altern Med. – 2014. - №14. DOI:10.1186/1472-6882-14-218

69. Ahmed, H.M. Ethnopharmacobotanical study on the medicinal plants used by herbalists in Sulaymaniyah Province, Kurdistan, Iraq. J Ethnobiology Ethnomedicine 12, 8 (2016). DOI:10.1186/s13002-016-0081-3

70. Soelberg, J. Comparative ethnobotany of the Wakhi agropastoralist and the Kyrgyz nomads of Afghanistan/ J. Soelberg, A.K. Jäger // J Ethnobiology Ethnomedicine 12, 2 (2016). DOI:10.1186/s13002-015-0063-x

71. Di Sanzo, P. Medicinal and useful plants in the tradition of Rotonda, Pollino National Park, Southern Italy/ P. Di Sanzo, L. De Martino, E. Mancini, et al. //J Ethnobiology Ethnomedicine. - 2013. -№9. DOI:10.1186/1746-4269-9-19

72. Pathy, K.K. Ethnobotanical characterization of medicinal plants used in Kisantu and Mbanza-Ngungu territories, Kongo-Central Province in DR Congo/ K.K. Pathy, N.B. Flavien, B.K. Honoré, et al. //J Ethnobiology Ethnomedicine. – 2021. - №17. DOI:10.1186/s13002-020-00428-7

73. Montesano, V. Notes about the uses of plants by one of the last healers in the Basilicata Region (South Italy)/V. Montesano, D. Negro, G. Sarli, et al. //J Ethnobiology Ethnomedicine. – 2012. -№8. DOI:10.1186/1746-4269-8-15

74. Государственный реестр лекарственных средств [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://grls.rosminzdrav.ru/GRLS.aspx>. (Дата обращения 25.04.2022).

75. Реестр свидетельств о государственной регистрации (единая форма Таможенного союза, российская часть) [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://fp.crc.ru/evrazes/?type=max> (Дата обращения 25.04.2022).

76. The Plant List, электронная база данных ботанических названий видов растений и систематики. [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.theplantlist.org/> (дата обращения: 30.04.2022).

77. Полянская, Т.А. Экологические особенности, онтогенетическая структура и продуктивность ценопопуляций *Vaccinium myrtillus* L. (*Ericaceae*) в национальном парке «Марий Чодра» (Республика Марий Эл) / Т.А. Полянская // Растительные ресурсы. – 2008. – Вып.2. – С. 41-49.

78. Устенова, Г.О. Правила сбора, заготовки и хранения лекарственного растения ортилии однобокой (*Orthilia secunda*)/ Г.О. Устенова, А.Л. Ахелова, А.А. Нурланова, А.Н. Рузуванова // Вестник КазНМУ. - 2018. - №1. С.345 -347.

79. Привалова, Е.Г. Виды рода *Pyrola l. (pyrolaceae)* Восточной Сибири: ботанико-географическая и фитохимическая характеристика// Инновационные технологии в фармации: сборник научных трудов / Под

общей редакцией Е.Г. Приваловой. – Выпуск 6. – Иркутск: ИГМУ, 2019. – С. 299-309.

80. Beatty, G. E. Comparative phylogeography of two related plant species with overlapping ranges in Europe, and the potential effects of climate change on their intraspecific genetic diversity/ G. E. Beatty, J. Provan// BMC Evolutionary Biology. – 2011. - №11. DOI:10.1186/1471-2148-11-29.

81. Бесплатный и открытый доступ к данным о биоразнообразии, электронная база данных. [Электронный ресурс]. - URL: <https://www.gbif.org/> (Дата обращения 30.04.2022)

82. Ботоева, Е. А. О химико-фармакологической характеристике фитосредств, использованных для экспериментальной фармакотерапии повреждений матки/ Е.А. Ботоева// Вестник БГУ. – 2011. - №12. - С.147-153.

83. Фадеева, Н. И. Сравнительная оценка эффективности разных фитопрепаратов, содержащих ортилию однобокую (*Orthilia secunda*), в лечении хронического эндометрита/ Н.И. Фадеева// Бюллетень медицинской науки. – 2017. - №7. - С.43-46.

84. Скоропацкая, О.А. Эффективность экстракта ортилии однобокой (*Orthilia secunda* (L.) House) в нормализации рецепции эндометрия к эстрогенам и прогестерону у пациенток с хроническим эндометритом/ О.А. Скоропацкая, Т.А. Кузнецова, Т. С. Таранина, Т.А. Болгова // МиД. - 2016. - №3. - С. 39 – 41.

85. Ботоева, Е. А. Оценка фармакотерапевтической эффективности сухого экстракта ортилии однобокой/ Е.А. Ботоева, И.П. Убеева, С.М. Николаев // Acta Biomedica Scientifica. - 2009. - №2. - С.100–102.

86. Ботоева, Е. А. Фармакологическое исследование сухих экстрактов ортилии однобокой и панцерии шерстистой/ Е.А. Ботоева, И.П. Убеева, С.М. Николаев, Д.Н. Оленников, Л.М. Танхаева // Сиб. мед. журн. (Иркутск).- 2010. - №6. - С.220–223.

87. Grech-Baran, M. Approaches of *Rhodiola kirilowii* and *Rhodiola rosea* field cultivation in Poland and their potential health benefits/M. Grech-Baran, K.

Syklowska-Baranek, A. Pietrosiuk // Ann Agric Environ Med. – 2015. - №22. – P.281-285. DOI:10.5604/12321966.1152081

88. Bai, XL. *Rhodiola* and salidroside in the treatment of metabolic disorders/ Deng XL, Wu GJ, Li WJ, Jin S. // Mini Rev Med Chem. – 2019. - №19. – P.1611-1626. DOI: 10.2174/1389557519666190903115424.

89. Chiang, H. M. *Rhodiola* plants: Chemistry and biological activity/H. Chiang, H. C. Chen, C. S. Wu, P. Y. Wu, K. C Wen // Journal of Food and Drug Analysis. - 2015. - №3. – P.359–369. DOI: 10.1016/j.jfda.2015.04.007.

90. Anghelescu, IG. Stress management and the role of *Rhodiola rosea*: a review/ IG. Anghelescu, D. Edwards, E. Seifritz, S. Kasper // Int J Psychiatry Clin Pract. – 2018. - №22. – P.242-252. DOI: 10.1080/13651501.2017.1417442

91. Li, Y. Antioxidative Effects of *Rhodiola Genus*: Phytochemistry and Pharmacological Mechanisms against the Diseases/ Y. Li, J. Wu, R. Shi, N. Li, Z. Xu, M. Sun//Curr Top Med Chem. – 2017. - №17. – P.1692-1708. DOI: 10.2174/1568026617666161116141334.

92. Государственная фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс] / МЗ РФ. – М., 2018. – [Электронный ресурс]. – URL: <http://femb.ru> (дата обращения: 11.05.2022).

93. Liu, Z. The chemotaxonomic classification of *Rhodiola plants* and its correlation with morphological characteristics and genetic taxonomy/ Z. Liu, Y. Liu, C. Liu., et al. // Chemistry Central Journal. -2013. -№7. DOI: 10.1186/1752-153X-7-118

94. Новости систематики высших растений. 1969. 6: 114.

95. Li, T. Application of microscopy in authentication of traditional Tibetan medicinal plants of five *Rhodiola (Crassulaceae)* alpine species by comparative anatomy and micromorphology/ T. Li, H. Zhang // Microsc Res Tech. – 2008. - №71. – P.448-58. DOI:10.1002/jemt.20570.

96. Борисова, А. Г. *Rhodiola quadrifida* — Родиола четырехчленная //Флора СССР: в 30 т./ гл. ред. В.Л.Комаров.—М.;Л.: Изд-во АН СССР, 1939.— Т. 9

97. Лёзина, А.В. Предварительный фитохимический скрининг ортилии однобокой и родиолы четырехлепестной/ А. В. Лёзина, Н. А. Снигирева, М.А. Романова, И.И. Тернинко, М.П. Блинова// Сборник материалов X Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 2020 г. – Санкт-Петербург: Изд-во СПХФУ, 2020. – С. 100-101.

98. Panossian, A. Rosenroot (*Rhodiola rosea*): traditional use, chemical composition, pharmacology, and clinical efficacy/ A. Panossian, G. Wikman, J. Sarris// *Phytomedicine*. - 2010. - №7. – P.481–93. DOI: 10.1016/j.phymed.2010.02.002.

99. Marchev, A. Authenticity and quality evaluation of different *Rhodiola species* and commercial products based on NMR-spectroscopy and HPLC/A. Marchev, I. Koycheva, I. Aneva, M. Georgiev // *Phytochemical Analysis*. – 2020. - №31. – P.756-769. DOI:10.1002/pca.2940

100. Tao, H. *Rhodiola species*: A comprehensive review of traditional use, phytochemistry, pharmacology, toxicity, and clinical study/ H. Tao, X. Wu, et al. // *Medicinal Research Reviews*. – 2019. – P.1-79. DOI:10.1002/med.21564

101. Tang, C. Traditional Tibetan Medicine in Cancer Therapy by Targeting Apoptosis Pathways/ C. Tang, CC. Zhao, H. Yi, et al.// *Front Pharmacol*. – 2020. - №11. DOI: 10.3389/fphar.2020.00976.

102. Troshchenko, A.T. Rhodioloside from *Rhodiola rosea* and *R. quadrifida* / A.T. Troshchenko, G.A. Kutikova // *Chem Nat Connect*. – 1967. - №3. – P.244-249.

103. Saratikov A.S. Separation and study of individual biologically active agents from *Rhodiola rosea* and *Rhodiola quadrifida*/A.S. Saratikov, E.A. Krasnov, L.A. Khnykina, L.M. Duvidzon // *Ser Biol Med Sci*. – 1967. - №1. - P.54-60.

104. Chiu, T.F. *Rhodiola crenulate* extract for prevention of acute mountain sickness: a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover trial/ T.F. Chiu, Chen, L.L.C., Su, DH. et al. // *BMC Complement Altern Med*. – 2013. - №13. DOI:10.1186/1472-6882-13-298

105. Hung, S.K. The effectiveness and efficacy of *Rhodiola rosea* L.: a systematic review of randomized clinical trials/S.K. Hung, R. Perry, E. Ernst// *Phytomedicine*. – 2011. - №18. – P.235-244. DOI:10.1016/j.phymed.2010.08.014
106. Kosakowska, O. Antioxidant and Antibacterial Activity of Roseroot (*Rhodiola rosea* L.) Dry Extracts/ O. Kosakowska, K. Bączek, J. L. Przybył, et al.// *Molecules*. - 2018. - №7. - P.1767. DOI: 10.3390/molecules23071767.
107. Grace, M.H. Phytochemical characterization of an adaptogenic preparation from *Rhodiola heterodonta*/ M.H. Grace, G.G. Yousef, A.G. Kurmukov, I. Raskin, M.A. Lila // *Nat Prod Commun*. – 2009. - №4. - P.1053-1058.
108. Бошкаева, К. Изучение Родиолы четырехраздельной (*Rhodiola quadrifida*) как источника биологически активных веществ/ К. Бошкаева, Р.А. Омарова, А.Л. Ахелова// *Вестник КазНМУ*. - 2014. - №5. - С.180-182.
109. Gao, J. Salidroside suppresses inflammation in a D-galactose-induced rat model of Alzheimer's disease via SIRT1/NF-κB pathway/ J. Gao, R. Zhou, X. You// *Metabolic Brain Disease*. - 2016. - №31. - P.771–778. DOI: 10.1007/s11011-016-9813-2
110. Yuan, Y. Salidroside alleviates liver inflammation in furan-induced mice by regulating oxidative stress and endoplasmic reticulum stress/Y. Yuan, Z. Wang, B. Nan, et al.// *Toxicology*. - 2021. DOI: 10.1016/j.tox.2021.152905
111. You, L. Salidroside protects endothelial cells against LPS-induced inflammatory injury by inhibiting NLRP3 and enhancing autophagy/ L. You, D. Zhang, H. Geng// *BMC Complementary Medicine and Therapies*. - 2021. - №146. DOI: 10.1186/s12906-021-03307-0.
112. Yang, D. W. Anti-inflammatory effect of salidroside on phorbol-12-myristate-13-acetate plus A23187-mediated inflammation in HMC-1 cells/D.W. Yang, O.H. Kang, Y. S. Lee, et al.// *International Journal of Molecular Medicine*. - 2016. - №6. - P.1864–1870. DOI: 10.3892/ijmm.2016.2781.
113. Zhao, G. Salidroside inhibits the growth of human breast cancer in vitro and in vivo/ G. Zhao, A. Shi, Z. Fan, Y. Du // *Oncology Reports*. - 2015. - №5. - P.2553–2560. DOI: 10.3892/or.2015.3857.

114. Лужанин, В. Г. Род *Ononis L.* (стальник) во флоре России и сопредельных государств : систематика и филогения : диссертация ... кандидата биологических наук : 03.02.01 / В. Г. Лужанин; [Место защиты: Ботан. ин-т им. В.Л. Комарова РАН]. – Санкт-Петербург, 2013. – 133 с.

115. В.И. Чуешов, М. Ю. Чернов, Л. М. Хохлова и др. Промышленная технология лекарств. Учебник. В 2 т. Т. 2. / Под ред. проф. В. И. Чуешова. – Харьков: МТК-Книга; НФаУ, 2002. 716 с. 10. П.П. Ветров, С.В. Гарная, С. О. Прокопенко, О.В. Кучер. Технологические параметры растительного сырья // Фармац. журн. 1987. № 3. С. 52–56.

116. П.П. Ветров, С.В. Гарная, С. О. Прокопенко, О.В. Кучер. Технологические параметры растительного сырья // Фармац. журн. 1987. № 3. С. 52–56.

117. Ковалев, В. Н. Практикум по фармакогнозии : учеб. пособ. / В. Н. Ковалева и др. – Х.: Изд-во НФаУ : Золотые страницы, 2003. – 512 с.

118. Онищенко, У. Е. Фармакогностическое изучение мальвы лесной и перспективы применения ее в медицине: дис. на соиск. учен. степени канд. фарм. наук: спец. 15.00. 02 / У. Е. Онищенко. – Запорожье, 2013. – 25 с.

119. О Гаврилин, М. В. Фенольные соединения надземной части шалфея мускатного (*Salvia sclarea L.*), культивируемого в Ставропольском крае / М. В. Гаврилин, О. И. Попова, Е. А. Губанова // Химия растительного сырья. – 2010. – №. 4. – С. 99–104.

120. Определение фармако-технологических параметров и фармакопейных показателей качества лекарственного растительного сырья зизифоры бунге / К.А. Жапаркулова, З. Сакипова, И. И. Тернинко [и др.] // Вестник Алматинского технологического университета. – 2016. – Т. 1. – С. 82-87.

121. Лобанова, И. Ю. Выделение и изучение состава флавоноидов листьев осины обыкновенной / И. Ю. Лобанова, В. Ф. Турецкова // Химия растительного сырья. – 2011. – №. 2. – С. 117-122.

122. HPTLC Assotiation, электронная база данных. [Электронный ресурс]. - URL: <https://www.hptlc-association.org/home.cfm> (Дата обращения 01.02.2022).

123. Сысоева, М. А. Исследование золя водных извлечений чаги. XIII. Биологически активные вещества коллоидной системы, формируемой после удаления дисперсной фазы из водного извлечения чаги хлористоводородной кислотой / М. А. Сысоева, В. Р. Хабибрахманова, В. С. Гамаюрова // Химия растительного сырья. – 2009. – №. 3. – С. 151–156.

124. Патент РФ № 2015127130, 06.07.2015. Способ идентификации и отдельного количественного определения танина и галловой кислоты при совместном присутствии в растительном сырье и фитопрепаратах без предварительного разделения//Патент России №2613878. 2017. Бюл. №9./ Тринеева О.В., Сливкин А.И.

125. The European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition. [Электронный ресурс]. - URL: <https://pheur.edqm.eu/home>. (Дата обращения 18.04.2022)

126. PASSonline [Электронный ресурс]. – URL: <http://www.way2drug.com/passonline/predict.php> (Дата обращения 20.04.2022)

127. Keats, E. C. Multiple-micronutrient supplementation for women during pregnancy/ E. C. Keats, B. A Haider, E Tam, Z. A Bhutta// Cochrane Database of Systematic Reviews. – 2019. - №3. DOI: 10.1002/14651858.cd004905.pub6.

128. Коденцова, В. М. Витамины и минералы как фактор предупреждения дефектов развития плода и осложнений беременности / В.М. Коденцова //Медицинский совет. – 2016. - №9. – С.106-114. DOI: 10.21518/2079-701X-2016-9-106-114.

129. Куркин, В. А. Родиола розовая (золотой корень): стандартизация и создание лекарственных препаратов: монография. Самара: ООО «Офорт»: ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России; 2015. 240 с.

130. Ахмеджанова, З. И. Макро- и микроэлементы в жизнедеятельности организма и их взаимосвязь с иммунной системой (обзор

литературы)/ З. И. Ахмеджанова, Г. К. Жиемуратова, Е. А. Данилова, Д. А.Каримов // Журнал теоретической и клинической медицины. – 2020. - №1. - С.16-21.

131. Громова, О. А. Анализ молекулярных механизмов воздействия железа (II), меди, марганца в патогенезе железодефицитной анемии/ О.А. Громова, И. Ю. Торшин, А. К. Хаджидис // Клиническая фармакология и фармакоэкономика. – 2010. - №1. - С.1-9.

132. Prasad, A.S. Zinc in Human Health: Effect of Zinc on Immune Cells/ A.S. Prasad// Molecular Medicine. – 2008. №14. - P.353–357. DOI: 10.2119/2008-00033.

133. Олина, А. А. Значение дефицита цинка в формировании нарушений репродуктивного здоровья (обзор литературы)/ А.А. Олина, Г.К. Садыкова// Пермский медицинский журнал.- 2015. - №32. - С.138-143. DOI: 10.17816/pmj325138-143.

134. Brueggemeier, R.W. Effects of phytoestrogens and synthetic combinatorial libraries on aromatase, estrogen biosynthesis, and metabolism/ R.W. Brueggemeier, X. Gu, J.A. Mobley, S. Joomprabutra, A.S. Bhat, J.L. Whetstone // Ann.N.Y. Acad. Sci. – 2001. - №948. P. 51–66. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03986.x.

135. Мельников, Н.Н. Пестициды и регуляторы роста растений: Справочник/ Н. Н. Мельников, К. В. Новожилов, С. Р. Белан // Химия. - 1995. — 576 с.

 Fitoleum <small>Since 1992</small>	www.fitoleum.kz		
Қазақстан Республикасы, Есік к., Маметова к-сі, 25, Алматы қ., Сейфуллин д-лы, 163 "а"	Республика Казахстан, г. Есік, ул. Маметовой, 25, г. Алматы, пр-т Сейфуллина, 163 "а"	Republic of Kazakhstan, Mаметova st. 25, Esik, Seifullin ave. 163 "a", Almaty	+7 (727) 297 27 00 +7 (727) 297 27 01 +7 (727) 297 29 36 info@fitoleum.kz

УТВЕРЖДАЮ
 Директор ТОО «ФитОлеум»



Сермухаметова Г.В.

« 06 » июня 2022 г.



**АКТ О ВНЕДРЕНИИ
 РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКО РАБОТЫ**

Наименование предложений для внедрения: подходы к стандартизации (методики контроля, показатели качества и критерии их приемлемости) травы ортилии однобокой, корневищ и корней родиолы четырехлепестной, полученные при выполнении диссертационной работы «Фитохимическая оценка и стандартизация сырья Родиолы четырехлепестной и Ортилии однобокой». Результаты представлены в проектах ФС:

- Проект ФС «Ортилии однобокой трава»
- Проект ФС «Родиолы четырехлепестной корневища и корни»

Автор разработки: Лёзина Алёна Владимировна, аспирант кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Тернико Инна Ивановна, д.фарм.н., профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет».

Где и куда внедрено: использовано в производственной деятельности ОКК ТОО «ФитОлеум» (Республика Казахстан) в рамках проведения входного контроля травы ортилии однобокой, корневищ и корней родиолы четырехлепестной.

Результаты внедрения: методики контроля качества ЛРС, предложенные авторами, воспроизводимы, просты, экспрессны и применимы в условиях ОКК предприятия. Они дают возможность полной оценки качества лекарственных растительных препаратов на основе ортилии однобокой и родиолы четырехлепестной.

Руководитель ОКК ТОО «ФитОлеум»		Перверзева И.В. «06» июня 2022 г.
------------------------------------	---	--------------------------------------

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

«УТВЕРЖДАЮ»
Начальник испытательной лаборатории
СПб ГБУЗ «Северо-Западный центр по
контролю качества лекарственных средств»
Сергеева А.В.

« 14 » июня 2022 г.



АКТ О ВНЕДРЕНИИ
РЕЗУЛЬТАТОВ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЙ РАБОТЫ

Наименование предложений для внедрения: подходы к стандартизации (методики контроля, показатели качества и критерии их приемлемости) травы ортилии однобокой, корневища и корней родиолы четырехлепестной и сбора гинекологического №1, полученные при выполнении диссертационной работы «Фитохимическая оценка сырья *Orthilia secunda L.* и *Rhodiola quadrifida* – потенциальных кандидатов для лечения гинекологических патологий». Результаты представлены в проектах ФС и НД:

- Проект ФС «Ортилия однобокой трава»
- Проект ФС «Родиолы четырехлепестной корневища и корни»
- Проект НД «Сбор гинекологический №1»

Автор разработки: Лёзина Алёна Владимировна, аспирант кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет», Теринико Инна Ивановна, профессор кафедры фармацевтической химии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет».

Где и куда внедрено: использовано в практической деятельности СПб ГБУЗ «СЗЦККЛС» при проведении контроля качества ЛРС, фармацевтических субстанций растительного происхождения и лекарственных растительных препаратов.

Результаты внедрения: методики контроля качества ЛРС, предложенные авторами, воспроизводимы, просты, экспрессны. Они способствуют повышению объективности оценки качества лекарственных растительных препаратов на основе ортилии однобокой и родиолы четырехлепестной, а также создают предпосылки для регистрации данных лекарственных средств и сбора на их основе.

Провизор-аналитик

Handwritten signature

Козлова Н.В.

УТВЕРЖДАЮ
Ректор ФГБОУ ВО СПХФУ
Минздрава России,
д.фарм.н., профессор

И. А. Наркевич



2022 г.

**Акт внедрения
результатов научно-практической работы
в научный процесс**

Комиссия в составе:

Председатель	проректора по научной работе, д-р. фармацевт. наук.	Е.В. Флисюк
и члены комиссии	научный сотрудник департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров директора департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, канд. биол. наук	К. О. Сидоров И. А. Титович

назначенная приказом ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России от «12» марта 2021 г. № 100, составила акт о нижеследующем.

Результаты диссертационного исследования Лёзиной Алёны Владимировны на тему «Фитохимическая оценка сырья *Orthilia secunda* L. и *Rhodiola quadrifida* – потенциальных кандидатов для лечения гинекологических патологий», представленного на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, а именно: «Методика выделения и установления структуры индивидуальных соединений из сырья *Rhodiola quadrifida*», «Методика проведения ВЭТСХ - анализа для *Orthilia secunda* L. и *Rhodiola quadrifida*», «Параметры стандартизации сырья *Orthilia secunda* L. и *Rhodiola quadrifida*», «Валидация УФ-спектрофотометрической методики количественного определения галловой кислоты в растительном сборе» внедрены в научную деятельность кафедры фармакогнозии в части выделения индивидуальных соединений фенольного характера, установления их структуры, комплексной фитохимической оценки и профилирования растений рода Родиола в сравнительном аспекте и Ортилии однобокой.

Председателя	проректора по научной работе, д-р. фармацевт. наук.	Е.В. Флисюк
и членов комиссии	научный сотрудник департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров директора департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, канд. биол. наук	К. О. Сидоров И. А. Титович

УТВЕРЖДАЮ
Ректор ФГБОУ ВО СПХФУ
Минздрава России,
д.фарм.н., профессор



И. А. Наркевич

« 15 » 03 2022 г.

Акт внедрения
результатов научно-практической работы
в учебный процесс

Комиссия в составе:

Председателя	проректора по учебной работе, канд. фармацевт. наук.	Ю. Г. Ильиновой
и членов комиссии	начальника учебно-методического отдела директора департамента науки и подготовки научно-педагогических кадров, канд. биол. наук	Д.С. Грищаненко И. А. Титович

назначенная приказом ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России от «12» марта 2021 г. № 100, составила акт о нижеследующем.

Результаты диссертационного исследования Лёзиной Алёны Владимировны на тему «Фитохимическая оценка сырья *Orthilia secunda* L. и *Rhodiola quadrifida* – потенциальных кандидатов для лечения гинекологических патологий», представленного на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, а именно: «Фитохимический профиль *Rhodiola quadrifida* и *Orthilia secunda*», «Методика определения подлинности сырья растений рода *Rhodiola* методом ВЭТСХ» внедрены в учебный процесс по учебной дисциплине «Основы фитохимии» в рамках программы высшего образования – программы бакалавриата по направлению подготовки 04.03.01 «Химия» очной формы обучения.

Председатель	проректор по учебной работе, канд. фармацевт. наук.		Ю. Г. Ильинова
члены комиссии	начальник учебно-методического отдела директора департамента науки и подготовки научно-педагогических кадров, канд. биол. наук		Д.С. Грищаненко
			И. А. Титович

Проект фармакопейной статьи
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Ортилии однобокой трава	ФС X.X.XXXX.XX
<i>Orthiliae secundae herba</i>	<i>Вводится впервые</i>

Собранная в начале цветения и высушенная надземная часть дикорастущего многолетнего травянистого растения ортилии однобокой – *Orthilia secunda* (L.) House., сем. вересковых – *Ericaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Облиственные стебли длиной до 15 см, не ветвистые, тонкие, с двумя выступающими ребрами. Листья расположены у основания стебля, простые, короткочерешковые, овальные с заостренной верхушкой, край пильчатый, сверху темно-зеленые, снизу – светло-зелёные. Длина листовой пластинки 2–3,5 см, ширина до 3 см. Жилкование перисто-сетчатое, главная жилка выступает с нижней стороны листа. Черешки с желобом, голые, темно-зеленые, длиной до 1,5 см

Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка вяжущий.

Измельчённое сырье. Кусочки листьев и стеблей различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями 7 м. Цвет от светло-зеленого до темно-зеленого. Запах слабый. Вкус водного извлечения слегка вяжущий.

Микроскопические признаки *Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении листа с поверхности видны клетки эпидермы с чётковидно утолщенными извилистыми клеточными стенками (рис. 1А). Клетки эпидермы верхней и нижней стороны листа сходны по форме (рис. 1А, Б). Устьица овально-округлой формы располагаются только на нижней стороне листовой пластинки (гипостоматический тип листа) (рис. 1Б, В). Устьичный аппарат аномоцитного типа имеет от 2 до 6 околоустьичных клеток.

На поперечных срезах листа заметна кутикула, особенно развитая на верхней стороне листа (рис. 2 а). Для мезофилла листа характерно отсутствие разделения на палисадную и губчатую ткань (рис. 2 б). Обнаруживается гомогенное строение хлоренхимы, состоящей из округлых клеток, расположенных в 4-5 слоев (рис. 2 с). В центральной жилке листа - закрытый коллатеральный проводящий пучок (рис. 2 е).

Стебель имеет вторичное непучковое строение – флоэма и ксилема располагаются кольцами (рис. 3А). Покровная ткань стебля - эпидерма, покрыта кутикулой. Под ней располагаются 3-4 ряда клеток уголкового колленхимы. Первичная кора состоит из 4-5 рядов паренхимных клеток. В клетках коры заметны крупные включения – друзы оксалата кальция (рис. 3Б h).

Камбиальный слой слабо заметен. В ксилеме заметны годовичные кольца в количестве 2–3. Клетки сердцевинки тонкостенные, крупные (рис. 3А g).

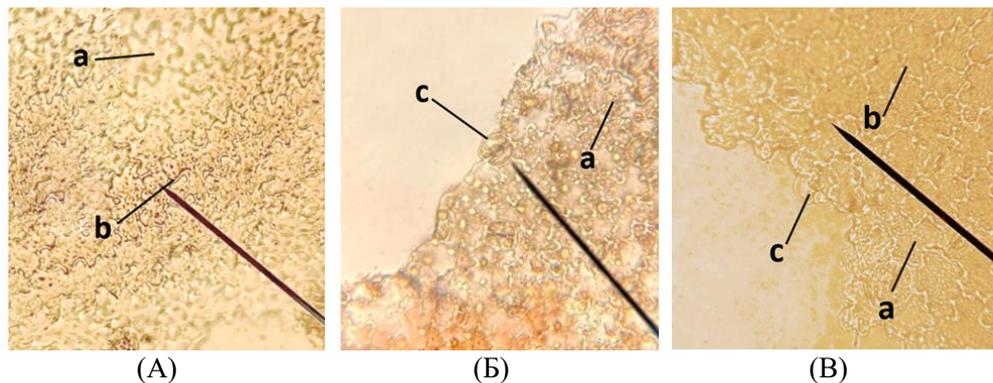


Рис. 1 – Препарат листа ортилии однобокой с поверхности ($\times 40$). А – верхняя сторона листовой пластинки; Б, В – нижняя сторона листовой пластинки

а — эпидермис, б — утолщения клеточной стенки, с — устьица

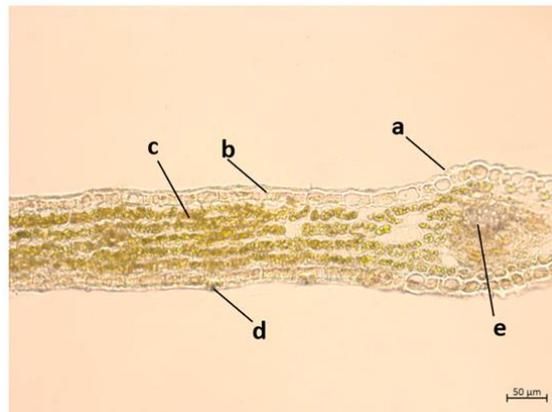
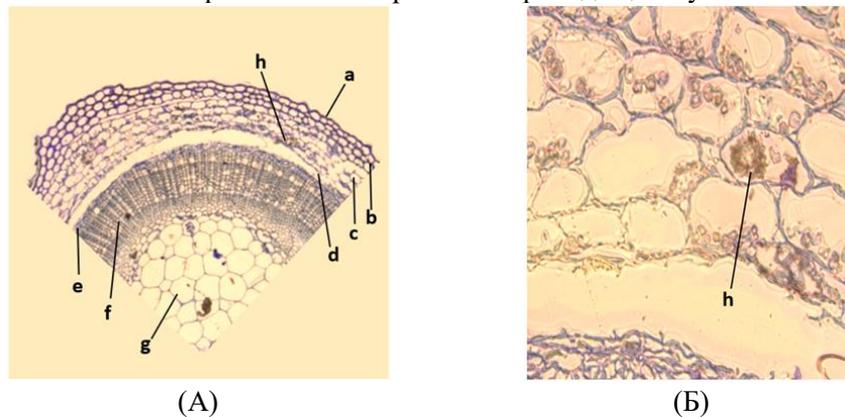


Рис. 2 – Поперечный срез листа ортилии однобокой ($\times 20$)
 а — кутикула, b — клетки мезофилла, с — хлоренхима, d — устьица, е —
 закрытый коллатеральный проводящий пучок



(А) (Б)
 Рис. 3 А ($\times 10$), Б ($\times 20$)– Поперечный срез стебля ортилии однобокой
 а — эпидерма + кутикула, b — колленхима, с — первичная кора, d —
 флоэма, е — камбий, f — ксилема, g — клетки сердцевины, h — друзы

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов

Раствор стандартного образца (СО) галловой кислоты: около 0,2 г (точная навеска) СО галловой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте 96% и доводят объем раствора тем же растворителем до метки и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут.

Боратный буферный раствор рН 9,0: в мерную колбу вместимостью 100 мл отмеривают 85 мл (точный объем) 0,05М раствора тетрабората натрия и 15 мл 0,1М раствора соляной кислоты, при необходимости доводят до метки раствором тетрабората натрия, перемешивают. Значение рН контролируют потенциометрически.

Около 2,0 г сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, экстрагируют спиртом 70 % в соотношении 1:4 с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение часа. Затем колбу охлаждают и извлечение отфильтровывают через бумажный фильтр. Процесс экстрагирования повторяют.

Водно-спиртовые извлечения объединяют, отстаивают в холодильнике 24 часа, после чего отфильтровывают (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят 5 мкл испытуемого раствора; рядом наносят 20 мкл раствора СО галловой кислоты.

Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение 2-3 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесью растворителей этилацетат - муравьиная кислота - вода (88:6:6) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей пройдет около 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длинах волн 254 и 365 нм.

По окончании хроматографирования пластинку выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100–105 °С в течение 2–3 мин и просматривают в УФ-свете при длине волн 254 и 365 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться 1 зона адсорбции с флуоресценцией темно-серого цвета при просмотре в УФ-свете 254 нм и синего цвета при 366 нм на уровне зоны адсорбции СО галловой кислоты. Выше зоны адсорбции галловой кислоты должна

наблюдаться зона адсорбции серого цвета при просмотре в УФ-свете 366 нм (арбутин). Допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 10 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,5%.

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

Посторонние примеси

Сырье, изменившее окраску (пожелтевшее и почерневшее). *Цельное сырье, измельченное сырье* - не более 7 %;

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3 %;

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1%.

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:*

Содержание галловой кислоты в пересчете на абсолютно сухое сырье - не менее 6 %;

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Около 5 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 500 мл, заливают нагретой до кипения водой в количестве 200 мл, кипятят с обратным холодильником при периодическом перемешивании в течение 30 минут. Затем извлечение процеживают через несколько слоев марли, не дожидаясь охлаждения, в мерную колбу вместимостью 200 мл и доводят объем раствора водой до метки (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу объемом 25 мл, доводят до метки боратым буферным раствором с рН 9,0 (раствор Б испытуемого раствора).

1,0 мл раствора Б испытуемого раствора помещают в мерную колбу на 10 мл, доводят до метки боратым буферным раствором с рН 9,0 (раствор В испытуемого раствора).

Измеряют оптическую плотность раствора В испытуемого раствора на спектрофотометре при длинах волн 275 ± 2 нм и 305 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют боратым буферный раствор с рН 9,0.

Содержание галловой кислоты в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляли по методу Фирордта по формулам (1, 2):

$$C_{ГК} = \frac{A_2^{\lambda_2} \times A_1^{\lambda_1} - A_2^{\lambda_1} \times A_1^{\lambda_2}}{(A_1^{\lambda_1} \times A_2^{\lambda_2} - A_1^{\lambda_2} \times A_2^{\lambda_1}) \times l} = \frac{619,43 \times A_1^{\lambda_1} - 348,99 \times A_2^{\lambda_2}}{(426,44 \times 619,43 - 141,804 \times 348,99)} = \frac{619,43 \times A_1^{\lambda_1} - 348,99 \times A_2^{\lambda_2}}{0,21 \times 10^6}, (1)$$

где

$C_{ГК}$ - концентрация ГК

$A_1^{\lambda_1}$ - величина удельного показателя поглощения ГК при 275 нм, равная 426,44;

$A_1^{\lambda 2}$ - величина удельного показателя поглощения ГК при 305 нм, равная 141,804;

$A_2^{\lambda 1}$ - величина удельного показателя поглощения танина при 275 нм, равная 348,99;

$A_2^{\lambda 2}$ - величина удельного показателя поглощения танина при 305 нм, равная 619,43;

$A^{\lambda 1}$ - оптическая плотность исследуемого извлечения при длине волны 275 ± 2 нм;

$A^{\lambda 2}$ - оптическая плотность исследуемого извлечения при длине волны 305 ± 2 нм;

l - толщина слоя, см³

$$X_{\text{ГК}}, \% = \frac{C_{\text{ГК}} \times V_{\text{МК1}} \times V_{\text{МК2}} \times V_{\text{МК3}} \times 100}{a \times (100 - W) \times V_{a1} \times V_{a2}} = \frac{C_{\text{ГК}} \times 200 \times 25 \times 10 \times 100}{a \times (100 - W) \times 1 \times 1} = \frac{C_{\text{ГК}} \times 0,5 \times 10^7}{a \times (100 - W)}, \quad (2)$$

где

$C_{\text{ГК}}$ - концентрация ГК

X - содержание ГК, %;

$V_{\text{МК1}} - V_{\text{МК3}}$ - объем мерных колб, взятых для разведения, мл;

a - масса сырья, г;

W - потеря в массе при высушивании сырья, %;

V_{a1} и V_{a2} - объемы аликвот извлечения, мл.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Проект фармакопейной статьи
МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Родиолы четырехлепестной корневища и корни	ФС Х.Х.ХХХХ.Х
<i>Rhodiolae quadrifidae rhizomata et radices</i>	<i>Вводится впервые</i>

Собранные в фазу окончания вегетации, очищенные и отмытые от земли, разрезанные на куски и высушенные корневища и корни дикорастущего многолетнего травянистого растения родиолы четырехлепестной – *Rhodiola quadrifida (Pall.) Fisch. & C.A.Mey*, семейство толстянковых – *Crassulaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. *Цельное сырье.* Куски корневищ и корней различной формы. Куски корневищ длиной до 7 см, толщиной - 1–2 см, поперечно - морщинистые, со следами отмерших стеблей. От корневища отходят многочисленные корни длиной 3–5 см, толщиной до 0,5 см. Поверхность корневища и корня матовая, темно-коричневого цвета. Цвет на изломе коричнево-красный или красно-коричневый. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения вяжущий.

Допустимая примесь - кусочки корневищ и корней различной формы коричнево-розового или розово-коричневого цвета с бело-розовыми, светло-желтыми, темно-коричневыми и коричневыми вкраплениями (родиола розовая).

Измельченное сырье. Кусочки корневищ и корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 3 мм. Цвет коричнево-красный или красно-коричневый с темно-коричневыми и коричневыми вкраплениями. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения вяжущий.

Порошок. Кусочки корневищ и корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет коричнево-красный или красно-коричневый с темно-коричневыми и коричневыми вкраплениями. Запах отсутствует. Вкус водного извлечения вязущий.

Микроскопические признаки. Цельное сырье.

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Растворы стандартного образца (СО) салидрозида. Около 0,1 г (точная навеска) СО салидрозида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в метаноле, доводят объем раствора до метки и перемешивают. Срок годности раствора 3 месяца в прохладном темном месте.

Раствор стандартного образца тирозола. Около 0,2 г (точная навеска) СО тирозола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в метаноле, доводят объем раствора до метки и перемешивают. Срок годности раствора 30 суток.

Раствор стандартного образца розарина. Около 0,1 г (точная навеска) СО розарина помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в метаноле, доводят объем раствора до метки и перемешивают. Срок годности раствора 3 месяца в прохладном темном месте.

Около 1,0 г измельченного сырья, проходящего сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл метанола, закрывают пробкой и экстрагируют на ультразвуковой водяной бане в течение 10 минут. Извлечение отфильтровывают через бумажный фильтр, отстаивают в холодильнике 24 часа и, при наличии, отфильтровывают выпавший осадок (*испытываемый раствор*).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором наносят 5 мкл испытуемого

раствора, 15 мкл раствора СО салидрозида и 30 мкл раствора СО тирозола, 5 мкл СО розарина. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 минут смесью растворителей: этилацетат-метанол-вода-муравьиная кислота (77:13:10:2); и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 5 минут и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться две зоны адсорбции серого цвета на уровне зон адсорбции СО салидрозида и тирозола. Отсутствует зона адсорбции фиолетового цвета на уровне зоны адсорбции СО розарина (отличие от родиолы розовой) после обработки анисовым альдегидом раствором серноокислым, допускается обнаружение других зон адсорбции.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 10 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 10 %.

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

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

Посторонние примеси

Другие части растения (листья, стебли, в том числе отделяемы при анализе). *Цельное сырье* - не более 5 %;

Сырье других видов рода Родиола – не более 5%;

Органическая примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1 %;

Минеральная примесь. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 3%.

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение.

Цельное сырье, измельченное сырье: салидрозида - не менее 0,5 %, тирозола - не менее 1%.

Приготовление растворов.

Раствор СО салидрозида (тирозола). Около 0,2 г (точная навеска) СО салидрозида и/ или тирозола растворяют в спирте 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А СО салидрозида (тирозола)).

1 мл раствора А СО салидрозида (тирозола) переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО салидрозида (тирозола)). Срок годности не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Приготовление фосфатного буфера рН 7,0

8,0 г гидроксида натрия растворяют в воде (около 500 мл), полученный раствор доводят водой до метки в мерной колбе вместимостью 1000 мл (раствор натрия гидроксида 0,2М).

Срок годности раствора 6 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Проверка пригодности хроматографической системы.

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

П- на хроматограммах растворов СО число теоретических тарелок должно быть не менее 2000 для пика салидрозида и не менее 5000 для пика тирозола;

-на хроматограммах растворов СО фактор асимметрии (Т) для пиков салидрозида и тирозола должен быть не менее 0,8 и не более 1,5.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 70-80 мл спирта 70 %, закрывают пластмассовой пробкой и экстрагируют в течение 30 мин в ультразвуковой бане. Охлажденное до комнатной температуры извлечение вместе с частичками корневищ и корней, смывая их спиртом 70 %, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят спиртом 70 % до метки и тщательно перемешивают. Около 3-5 мл полученного раствора фильтруют через мембранный нейлоновый фильтр (размер пор 0,45 мкм), отбрасывая первые 1-2 мл фильтрата.

Хроматографические условия.

Колонка	250 × 4,0 мм, эндкепированный октадецилсилил (С18) силикагель для хроматографии, 5 мкм
---------	--

Предколлонка	4 × 4 мм, эндкепированный октадецилсилил (C18) силикагель для хроматографии, 5 мкм
ПФ	смесь ацетонитрила (элюент А) и фосфатного буфера (рН 7,0) (элюент Б).
Способ элюирования	градиентный режим: 0–10 мин 11% элюента А, 10–30 мин 11-30% элюента А, 30–35 мин 30-60% элюента А, 35 –45 мин 60% элюента А, 45 – 50 мин 60-11% элюента А, 50-70 мин 11% элюента А.
Скорость потока, мл/мин	1
Температура колонки, °С	50±1
Детектор	Спектрофотометрический или диодноматричный, $\lambda=220$ нм
Объем вводимой пробы, мкл	20
Время хроматографирования, мин	35

Хроматографируют последовательно не менее 5 раз растворы Б СО салидрозида и СО тирозола и вычисляют среднее значение площади пика для каждого СО.

Испытуемый раствор хроматографируют не менее 3 раз.

Идентификацию пиков на хроматограмме испытуемого раствора проводят по времени удерживания в сравнении с хроматограммами внешних стандартов — растворов Б СО салидрозида (около 5,86 мин) и СО тирозола (около 9,4 мин).

Содержание каждого родоспецифичного фенольного соединения в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \times C_0 \times P \times 100 \times 100 \times 100\%}{S_0 \times a_1 \times 100 \times (100 - W)} = \frac{S_1 \times C_0 \times P \times 100 \times 100\%}{S_0 \times a_1 \times (100 - W)},$$

где

S_1 - площадь пика соответствующего соединения в испытуемом растворе;

S_0 - площадь пика соответствующего СО;

C_0 - концентрация соответствующего СО, г/мл,

a_1 - навеска сырья, г

P – содержание соответствующего соединения в СО, %

W - влажность сырья, %

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

СОГЛАСОВАН

УТВЕРЖДЕН

 (наименование уполномоченного
 органа государства признания)

 (наименование уполномоченного
 органа референтного государства)

 (Ф.И.О., должность, подпись)

 (Ф.И.О., должность, подпись)

«__» _____ 20__ г.
 М.П.

«__» _____ 20__ г.
 М.П.

СОГЛАСОВАН

Федеральное государственное бюджетное
 учреждение высшего образования
 Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет
 Министерства Здравоохранения Российской Федерации
 (наименование заявителя или уполномоченного
 юридического лица)

Наркевич И. А.,
 ректор ФГБОУ ВО СПХФУ

 (Ф.И.О., должность, подпись)

«__» _____ 20__ г.
 М.П.

НОРМАТИВНЫЙ ДОКУМЕНТ

Торговое наименование лекарственного препарата:

«Сбор гинекологический № 1»

Международное непатентованное наименование: «Ортилии однобокой трава
 + Родиолы четырехлепестной корневища и корни»

(при его отсутствии – общепринятое группировочное наименование, при отсутствии последнего – химическое
 наименование)

Лекарственная форма: сбор

Масса ЛФ: 50 (100) г

Держатель регистрационного удостоверения: ФГБОУ ВО СПХФУ МЗ РФ
Российская Федерация

(наименование и страна держателя регистрационного удостоверения)

Номер и дата нормативного документа: _____ - _____

(номер и дата регистрационного удостоверения, выданного референтным государством)

НАИМЕНОВАНИЕ
«Сбор гинекологический № 1»
ФГБОУ ВО СПХФУ МЗ РФ Российская Федерация

Состав:

«Сбор гинекологический № 1», содержит:

Наименование компонентов	Количество, %	Спецификация
Ортилии однобокой трава	33	Проект ФС «Ортилии однобокой трава»
Родиолы четырехлепестной корневища и корни	67	Проект ФС «Родиолы четырехлепестной корневища и корни»

СПЕЦИФИКАЦИЯ

«Сбор гинекологический № 1»
ФГБОУ ВО СПХФУ МЗ РФ Российская Федерация

Показатели	Методы	Нормы
Подлинность	ГФ РФ Визуальный	В соответствии с проектом НД
	ГФ РФ Микроскопический визуальный	В соответствии с проектом НД
	ГФ РФ ТСХ <i>-галловая кислота</i> <i>-салидрозид</i>	На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться 1 зона адсорбции с флуоресценцией темно-серого цвета при просмотре в УФ-свете 254 нм и синего цвета при 366 нм на уровне раствора СО галловой кислоты; допускается наличие других зон адсорбции. На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться два пятна серого цвета на уровне раствора СО салидрозид и тирозола; допускается обнаружение других зон адсорбции.
Посторонние примеси	ГФ РФ Весовой	
	<i>Сырье, изменившее окраску (пожелтевшее и почерневшее)</i>	не более 4 %. -
	<i>Другие части растения (листья, стебли, в том числе отделяемые при анализе)</i>	не более 5 %. -
	<i>Органическая примесь</i>	не более 1 %.
	<i>Минеральная примесь</i>	не более 1%.
Влажность	ГФ РФ Гравиметрический	не более 10%.
Зола общая	ГФ РФ Гравиметрический	не более 7%.
Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте	ГФ РФ Визуальный	не более 4%.

Сумма экстрактивных веществ	ГФ РФ Гравиметрический	не менее 7%
Тяжелые металлы и мышьяк	ГФ-РФ АЭС-ИСП ААС	В соответствии с требованиями ОФС.1.5.3.0009.15
Микробиологическая чистота	ГФ РФ Биологический	Категория 4.А
Радионуклиды	ГФ РФ	В соответствии с требованиями ОФС.1.5.3.0001.15
Остаточные количества пестицидов	ГФ РФ ГХ-МС	В соответствии с требованиями ОФС.1.5.3.0011.15
Количественное определение	ГФ РФ УФ-СФМ	Содержание галловой кислоты в пересчете на абсолютно сухое сырье - не менее 4 %;
	ГФ РФ ВЭЖХ	Содержание салидрозида в пересчете на абсолютно сухое сырье - не менее 0,5%.
Упаковка	В соответствии с ГОСТ 17768-90. По 50 или 100 г в пакеты бумажные двойные или одинарные	
Маркировка	В соответствии с ГОСТ 17768-90. На пачке указывают страну, предприятие-изготовитель, и его товарный знак, название продукции на латинском и русском языках, массу в упаковке при максимально допустимой влажности, способ употребления, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности, штриховой код препарата, соответствие продукции требованиям НД.	
Условия хранения	В сухом, защищенном от света месте	
Срок годности	2 года	

НОРМАТИВНАЯ ДОКУМЕНТАЦИЯ**«Сбор гинекологический № 1»****Произведено: ФГБОУ ВО СПХФУ МЗ РФ Российская Федерация****Международное непатентованное наименование:**

«Ортилии однобокой трава + Родиолы четырехлепестной корневища и корни»

Содержит не менее 4% галловой кислоты, 0,5% салидрозида и 0,1% тирозола в пересчете на абсолютно сухое сырье.

Подлинность**Внешние признаки.**

Сбор измельченный. Смесь неоднородных частиц растительного сырья красно-коричневого цвета со светло-зелеными и темно-зелеными вкраплениями, измельченных до размера 7 мм.

При исследовании с помощью лупы (x10) или стереомикроскопа должны быть видны: кусочки корневищ и корней различной формы, как правило, морщинистые, со следами отмерших стеблей. Поверхность матовая, темно-коричневого цвета, на изломе красно-коричневого цвета (корневища и корни родиолы четырехлепестной); кусочки листьев, иногда с пильчатым краем, голых, темно-зеленых с одной стороны и светло-зеленых с другой, жилкование перисто-сетчатое, главная жилка выступает с нижней стороны листа. Запах слабый. Вкус водного извлечения вяжущий.

Микроскопические признаки.

При рассмотрении элементов листа ортилии однобокой с поверхности должны быть видны клетки эпидермы с чётковидно утолщенными извилистыми клеточными стенками (рис. 1А). Устьица овально-округлой формы располагаются только на нижней стороне листовой пластинки (гипостоматический тип листа) (рис. 1Б, В). Устьичный аппарат аномоцитного типа имеет от 2 до 6 околоустьичных клеток. Стебель должен иметь вторичное непучковое строение (рис. 2А). Покровная ткань стебля - эпидерма, покрыта кутикулой. Под ней располагаются 3-4 ряда клеток уголковой

колленхимы. Первичная кора должна состоять из 4-5 рядов паренхимных клеток. В клетках коры должны быть заметны крупные включения – друзы оксалата кальция (рис. 2Б h).

Камбиальный слой слабо заметен. В ксилеме заметны годовичные кольца в количестве 2–3. Клетки сердцевины тонкостенные, крупные (рис. 3А g).

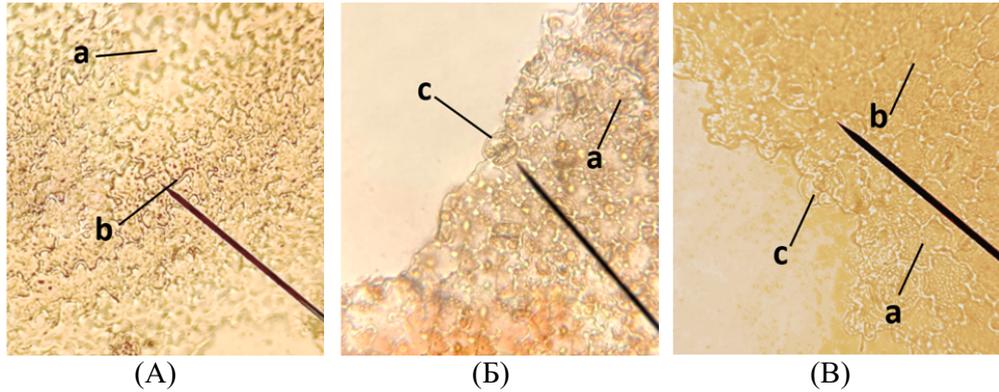


Рис. 1 – Препарат листа ортилии однобокой с поверхности (×40). А – верхняя сторона листовой пластинки; Б, В – нижняя сторона листовой пластинки

а — эпидермис, b — утолщения клеточной стенки, с — устьица

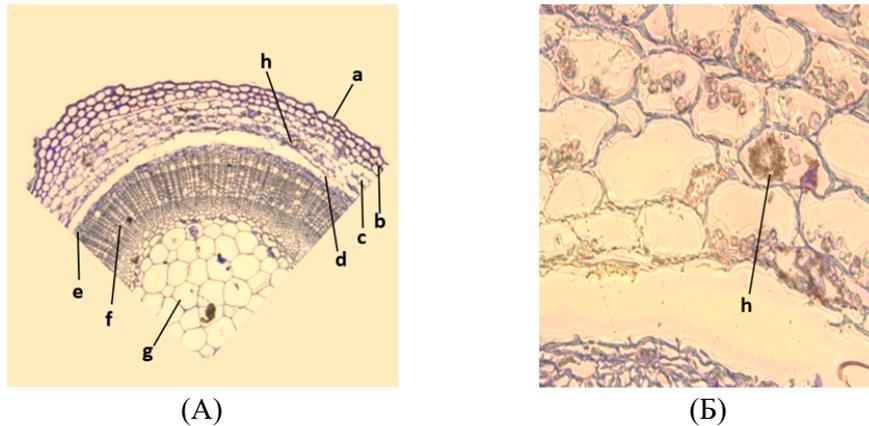


Рис. 2 А (×10), Б (×20)– Поперечный срез стебля ортилии однобокой
а — эпидерма + кутикула, b — колленхима, с — первичная кора, d — флоэма, е — камбий, f — ксилема, g — клетки сердцевины, h — друзы

Для элементов корня и корневища родиолы характерна многрядная слоистая пробка. Клетки пробкового слоя двоякие: наружные (рис. 3 Б) - уплощенные, деформированные, поперечно-вытянутые в длину,

толстостенные, окрашены в интенсивно красный цвет и суберинизированы; внутренние – толстостенные, округлые, расположены в 15-20 рядов. Под пробковым слоем должны наблюдаться крупные, тонкостенные клетки паренхимы коры, которые содержат крахмальные зерна.

Корневище (рис. 4) непучкового типа строения. На поперечном срезе должна дифференцироваться линия камбия, наружу от которой расположена флоэма (частично разрушенная), внутрь к центру корневища радиальными рядами расположены сосуды ксилемы. Сердцевина выполнена, клетки паренхимы сердцевины крупные, тонкостенные.

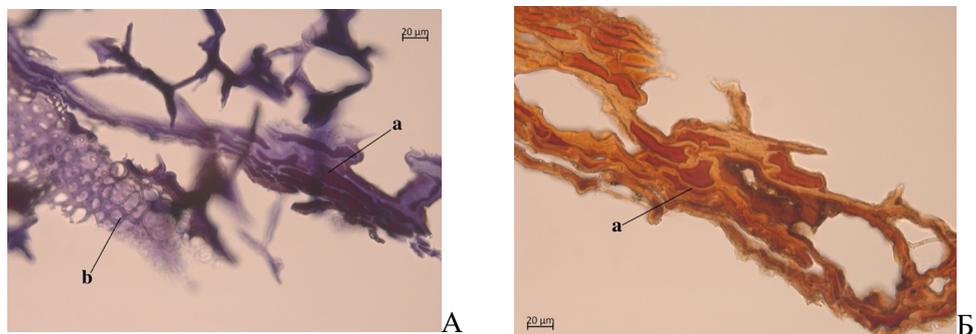


Рис. 3- Фрагменты поперечного среза сырья родиолы четырехлепестной: А – корня (x 40); Б – элементы пробки: а - наружные клетки пробкового слоя; б – внутренние клетки пробкового слоя

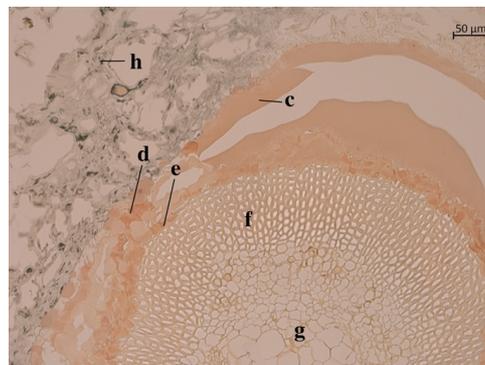


Рис. 4 – корневище родиолы четырехлепестной после окраски флороглюцином (x20): с – паренхима коры; d – флоэма; e – камбий; f – ксилема; g – клетки сердцевины; h – зерна крахмала

ТСХ.

Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ РФ, ОФС.1.2.1.2.0003.15 «Тонкослойная хроматография».

Галловая кислота, салидрозид, тирозол*Реактивы:*

Спирт этиловый 96% («х.ч.»)

Этилацетат («х.ч.»)

Муравьиная кислота («х.ч.»)

Хроматографическая система: этилацетат - муравьиная кислота - вода в соотношении 88:6:6

Раствор стандартного образца (СО) галловой кислоты: около 0,2 г (точная навеска) СО галловой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте 96% и доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают. Срок годности раствора 30 сут.

Испытуемый раствор: около 2,0 г сырья, измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, экстрагируют спиртом 70 % в соотношении 1:4 с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение часа. Затем колбу охлаждают и извлечение отфильтровывают через бумажный фильтр. Процесс экстрагирования повторяют. Водно-спиртовые извлечения объединяют, отстаивают в холодильнике 24 часа, после чего отфильтровывают.

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 × 15 см наносят 5 мкл испытуемого раствора; рядом наносят 20 мкл раствора СО галловой кислоты.

Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе в течение 2–3 мин, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 мин смесью растворителей этилацетат - муравьиная кислота - вода (88:6:6) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителей

НД _____ С. 9

пройдет около 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей и просматривают в УФ-свете при длинах волн 254 и 365 нм.

По окончании хроматографирования пластинку выдерживают в сушильном шкафу при температуре 100–105 °С в течение 2–3 мин и просматривают УФ-свете при длине волн 254 и 365 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться 1 зона адсорбции с флуоресценцией темно-серого цвета при просмотре в УФ-свете 254 нм и синего цвета при 366 нм на уровне раствора стандартного образца галловой кислоты; допускается обнаружение других зон адсорбции.

Салидрозид, тирозол

Реактивы:

Метанол («х.ч.»)

Этилацетат («х.ч.»)

Муравьиная кислота («х.ч.»)

Хроматографическая система: этилацетат-метанол-вода-муравьиная кислота в соотношении 77:13:10:2

Раствор стандартного образца (СО) салидрозида. Около 0,1 г (точная навеска) СО салидрозида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в метаноле, доводят объем раствора до метки и перемешивают. Срок годности раствора 30 суток.

Раствор стандартного образца (СО) тирозола. Около 0,2 г (точная навеска) СО тирозола помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в метаноле, доводят объем раствора до метки и перемешивают. Срок годности раствора 30 суток.

Испытуемый раствор: около 1,0 г измельченного сырья, проходящего сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, помещают в круглодонную колбу вместимостью 100 мл, экстрагируют 10 мл метанола на ультразвуковой водяной бане в течение 10 минут. Извлечение отфильтровывают через

бумажный фильтр, отстаивают в холодильнике 24 часа и, при наличии, отфильтровывают выпавший осадок (испытуемый раствор).

На линию старта аналитической хроматографической пластинки со слоем силикагеля с флуоресцентным индикатором на алюминиевой подложке размером 10 × 15 см наносят 5 мкл полученного фильтрата, 15 мкл раствора СО салидрозида и 30 мкл раствора СО тирозола. Пластинку с нанесенными пробами сушат на воздухе, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 30 минут смесью растворителей: этилацетат-метанол-вода-муравьиная кислота (77:13:10:2); и хроматографируют восходящим способом.

Когда фронт растворителей пройдет около 80–90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 5 минут и просматривают в УФ-свете при длинах волн 254 и 366 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться два пятна серого цвета на уровне СО салидрозида и тирозола, допускается обнаружение других зон адсорбции.

Посторонние примеси

Сырье, изменившее окраску (пожелтевшее и почерневшее.) Не более 4 % (ГФ РФ, ОФС.1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»).

Другие части растения (листья, стебли, в том числе отделяемые при анализе). Не более 5 % (ГФ РФ, ОФС.1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»).

Органическая примесь. Не более 1 % (ГФ РФ, ОФС.1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»).

Минеральная примесь. Не более 1% (ГФ РФ, ОФС.1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»).

Влажность. Не более 10% (ГФ РФ, ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья»).

Зола общая. Не более 7% (ГФ РФ, ОФС.1.2.2.2.0013.15 «Зола общая»).

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. Не более 4% (ГФ РФ, ОФС.1.5.3.0005.15 «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»).

Сумма экстрактивных веществ. Экстрактивных веществ, извлекаемых водой должно быть не менее 7% (ГФ РФ, ОФС.1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»).

Микробиологическая чистота

Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ РФ, ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота». Категория 4.А.

Радионуклиды.

Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ РФ, ОФС.1.5.3.0001.15 «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратов».

Остаточные количества пестицидов.

Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ РФ, ОФС.1.5.3.0011.15 «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Тяжелые металлы и мышьяк.

Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ РФ, ОФС.1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Количественное определение***Галловая кислота***

Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ РФ ОФС.1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в УФ и видимой областях».

Реактивы:

Натрия тетраборат «х.ч.»

Буферный раствор рН 9,0. В мерную колбу вместимостью 100 мл отмеривают 85 мл (точный объем) 0,05М раствора тетрабората натрия и 15 мл 0,1М раствора соляной кислоты, при необходимости доводят до метки раствором тетрабората натрия, перемешивают. Значение рН контролируют потенциометрически.

Раствор используют свежеприготовленным.

Испытуемый раствор:

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Около 5 г (точная навеска) исследуемого измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 500 мл, заливают нагретой до кипения водой в количестве 200 мл, кипятят с обратным холодильником при периодическом перемешивании в течение 30 минут. Затем извлечение процеживают через несколько слоев марли, не дожидаясь охлаждения, в мерную колбу вместимостью 200 мл и доводят объем раствора водой до метки (раствор А испытуемого раствора). 1 мл полученного раствора А помещают в мерную колбу объемом 25 мл, доводят до метки боратным буферным раствором с рН 9,0 (раствор Б). Из раствора Б берут аликвоту 1 мл и помещают в мерную колбу на 10 мл, доводят до метки буфером (раствор В – испытуемый раствор).

Срок годности всех испытуемых растворов при комнатной температуре – 4 часа.

Трехкратно измеряют оптическую плотность свежеприготовленного раствора В относительно боратного буферного раствора с рН 9,0 при длинах волн 275 ± 2 нм и 305 ± 2 нм. За результат анализа принимают среднее значение оптической плотности не менее трех измерений.

Содержание галловой кислоты рассчитывают по формулам (1, 2)

$$C_{ГК} = \frac{A_2^{\lambda 2} \times A_1^{\lambda 1} - A_2^{\lambda 1} \times A_1^{\lambda 2}}{(A_1^{\lambda 1} \times A_2^{\lambda 2} - A_1^{\lambda 2} \times A_2^{\lambda 1}) \times l} = \frac{619,43 \times A_1^{\lambda 1} - 348,99 \times A_2^{\lambda 2}}{(426,44 \times 619,43 - 141,804 \times 348,99)} = \frac{619,43 \times A_1^{\lambda 1} - 348,99 \times A_2^{\lambda 2}}{0,21 \times 10^6}, (1)$$

где

$C_{ГК}$ - концентрация ГК

$A_1^{\lambda 1}$ - величина удельного показателя поглощения ГК при 275 нм, равная 426,44;

$A_1^{\lambda 2}$ - величина удельного показателя поглощения ГК при 305 нм, равная 141,804;

$A_2^{\lambda 1}$ - величина удельного показателя поглощения танина при 275 нм, равная 348,99;

$A_2^{\lambda 2}$ - величина удельного показателя поглощения танина при 305 нм, равная 619,43;

$A_1^{\lambda 1}$ - оптическая плотность исследуемого извлечения при длине волны 275 ± 2 нм;

$A_1^{\lambda 2}$ - оптическая плотность исследуемого извлечения при длине волны 305 ± 2 нм;

l - толщина слоя, см³

$$X_{ГК}, \% = \frac{C_{ГК} \times V_{мк1} \times V_{мк2} \times V_{мк3} \times 100}{a \times (100 - W) \times V_{a1} \times V_{a2}} = \frac{C_{ГК} \times 200 \times 25 \times 10 \times 100}{a \times (100 - W) \times 1 \times 1} = \frac{C_{ГК} \times 0,5 \times 10^7}{a \times (100 - W)}, (2)$$

где

$X_{ГК}$ - содержание ГК, %;

$V_{мк1}$ - $V_{мк3}$ - объем мерных колб, взятых для разведения, мл;

a - масса сырья, г;

W - потеря в массе при высушивании сырья, %;

V_{a1} и V_{a2} - объемы аликвот извлечения, мл.

Содержание галловой кислоты в пересчете на абсолютно сухое сырье должно быть не менее 4 %;

Салидрозид

Испытание проводят в соответствии с требованиями ГФ РФ, ОФС.1.2.1.2.0005.15 «Высокоэффективная жидкостная хроматография», ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография».

Реактивы:

ацетонитрил («HPLC gradient grade» или аналогичного качества);

этанол 96% («gradient grade for liquid chromatography LiChrosolv» или аналогичного качества);

натрия гидроксид («х.ч.»)

калия фосфат однозамещенный («х.ч.»)

Фосфатный буферный раствор pH 6,0. 8

6,8 г калия фосфата однозамещенного растворяют в 500 мл воды в мерной колбе вместимостью 2000 мл, затем добавляют 130 мл раствора натрия гидроксида 0,2 М, добавляют еще 800 мл воды и перемешивают. Значение pH определяют потенциометрически. При необходимости добавляют раствор натрия гидроксида 0,2 М и доводят объем раствора водой до метки. Срок годности раствора 6 мес при хранении в хорошо укупоренной упаковке, в прохладном защищенном от света месте.

Приготовленный раствор фильтруют под вакуумом через нейлоновый мембранный фильтр с размером пор не более 0,45 мкм.

Подвижная фаза: смесь ацетонитрила (элюент А) и фосфатного буфера (pH 7,0) (элюент Б).

Испытуемый раствор. Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со

шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 70-80 мл спирта 70 %, закрывают пластмассовой пробкой и экстрагируют в течение 30 мин в ультразвуковой бане. Охлажденное до комнатной температуры извлечение вместе с частичками корневищ и корней, смывая их спиртом 70 %, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят спиртом 70 % до метки и тщательно перемешивают. Около 3-5 мл полученного раствора фильтруют через мембранный нейлоновый фильтр (размер пор 0,45 мкм), отбрасывая первые 1-2 мл фильтрата.

Раствор используют свежеприготовленным.

Раствор СО салидрозида. Около 0,2 г (точная навеска) СО салидрозида растворяют в спирте 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор А СО салидрозида).

1 мл раствора А СО салидрозида переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора спиртом 96 % до метки и перемешивают (раствор Б СО салидрозида). Срок годности не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Хроматографические условия.

Колонка	250 × 4,0 мм, эндкепированный октадецилсилил (С18) силикагель для хроматографии, 5 мкм
Предколонка	4 × 4 мм, эндкепированный октадецилсилил (С18) силикагель для хроматографии, 5 мкм
ПФ	смесь ацетонитрила (элюент А) и фосфатного буфера (рН 7,0) (элюент Б).
Способ элюирования	градиентный режим: 0–10 мин 11% элюента А, 10–30 мин 11-30%

	элюента А, 30–35 мин 30-60% элюента А, 35 –45 мин 60% элюента А, 45 – 50 мин 60-11% элюента А, 50- 70 мин 11% элюента А.
Скорость потока, мл/мин	1
Температура колонки, °С	50±1
Детектор	Спектрофотометрический или диодноматричный, λ=220 нм
Объем вводимой пробы, мкл	20
Время хроматографирования, мин	35

Хроматографическая система считается пригодной, если выполняются следующие условия:

- на хроматограммах растворов СО число теоретических тарелок должно быть не менее 2000 для пика салидрозида;

-на хроматограммах растворов СО фактор асимметрии (Т) для пика салидрозида должен быть не менее 0,8.

Хроматографируют последовательно не менее 5 раз раствор Б СО салидрозида и вычисляют среднее значение площади пика для каждого СО.

Испытуемый раствор хроматографируют не менее 3 раз. За результат анализа принимают среднее значение не менее трех измерений.

Идентификацию пиков на хроматограмме испытуемого раствора проводят по времени удерживания в сравнении с хроматограммами внешних стандартов — раствора Б СО салидрозида около 5,86 мин.

Содержание каждого родоспецифичного фенольного соединения в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \times C_0 \times P \times 100 \times 100 \times 100\%}{S_0 \times a_1 \times 100 \times (100 - W)} = \frac{S_1 \times C_0 \times P \times 100 \times 100\%}{S_0 \times a_1 \times (100 - W)},$$

где

S₁ - площадь пика соответствующего соединения в испытуемом растворе;

S_0 - площадь пика СО салидрозида;

C_0 - концентрация СО салидрозида, г/мл,

a_1 - навеска сырья, г

P – содержание салидрозида в СО, %

W - влажность сырья, %

Содержание салидрозида должно быть не менее 0,5%.

Упаковка

В соответствии с ГОСТ 17768-90. По 50 или 100 г в пакеты бумажные двойные или одинарные

Маркировка

В соответствии с ГОСТ 17768-90. На пачке указывают страну, предприятие-изготовитель, и его товарный знак, название продукции на латинском и русском языках, массу в упаковке при максимально допустимой влажности, способ употребления, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности, штриховой код препарата, соответствие продукции требованиям НД.

Условия хранения

В сухом, защищенном от света месте.

Срок годности

2 года.

Примечание.

Реактивы, индикаторы и титрованные растворы, приведенные в настоящей нормативной документации, описаны в соответствующих разделах действующего издания Государственной Фармакопеи РФ.

Руководитель предприятия-производителя

Наркевич И.А.