

НГУЕН ТХИ КИМ НГАН

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ
РАСТЕНИЙ РОДА ARISAEMA**

14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва - 2015

Диссертационная работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Ермакова Валентина Алексеевна — доктор фармацевтических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Киселева Татьяна Леонидовна - доктор фармацевтических наук, профессор, директор научно-исследовательского центра НО «Профессиональная Ассоциация Натуротерапевтов».

Потанина Ольга Георгиевна - доктор фармацевтических наук, директор центра научных исследований и разработок Центра коллективного пользования (научно-образовательный центр) ФГБОУ ВПО Российский университет дружбы народов.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР)

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2015 г. в _____ часов на заседании Диссертационного Совета Д -208.040.09 при ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России по адресу: 119019, г. Москва, Никитский бульвар, д. 13.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1 и на сайте ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова [http:// www.mma.ru](http://www.mma.ru)

Автореферат разослан «_____» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета Д -208.040.09,
доктор фармацевтических наук,
профессор

Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы.

Лекарственные средства растительного происхождения широко используются в медицинской практике. Они обладают разнообразными фармакологическими свойствами, низкой токсичностью и ценовой доступностью. Расширение ассортимента фитопрепаратов за счет рационального использования ресурсов дикорастущих лекарственных растений в различных регионах мира открывает новые возможности для фармацевтической науки и медицины.

Природное разнообразие флоры Юго-Восточной Азии представлено широким спектром пищевых, лекарственных, декоративных и технических растений. Однако, следует отметить слабую изученность многих перспективных для медицины видов с позиций ботанического ресурсоведения и фармакогностического анализа. К таким растениям относятся и виды рода Аризема (*Arisaema*).

Род Аризема, включает более 150 видов, произрастающих, в основном, в странах Юго – Восточной Азии, в Китае, на Дальнем Востоке РФ, в тропической зоне Африки.

Виды ариземы известны как декоративные и лекарственные растения. Они достаточно широко используются в традиционной медицине Китая : наружно в качестве отвлекающих средств в составе мазей, а также сырье, прошедшее специальную обработку, применяется как отхаркивающее средство. Лекарственные препараты из ариземы используются также при некоторых заболеваниях желудочно-кишечного тракта.

Порошок клубнелуковиц некоторых видов ариземы или сухой экстракт входит в состав комплексных китайских препаратов, разрешенных к медицинскому применению в ряде стран, в том числе и в России. В народной медицине сок клубней ариземы применяется в качестве противоревматического, антианемического, антисептического, противовоспалительного средства.

С фармакогностической точки зрения растения рода Аризема изучены недостаточно: сырье трех видов ариземы (ариземы амурской, ариземы разнолистной, ариземы красноватой) включено в настоящее время только в Государственную Фармакопею КНР.

Аризема единокровная, произрастающая во Вьетнаме, используется в народной медицине в качестве отхаркивающего, противосудорожного, противовоспалительного средства.

Сведения о химическом составе растения весьма разноречивы. Фармакологические свойства препаратов ариземы единокровной не изучались. В то же время растение достаточно широко распространено на территории Вьетнама и может обеспечить сырье для производства лекарственных средств.

Все изложенное выше свидетельствует об актуальности фармакогностического изучения ариземы единокровной (*Arisaema consanguineum* Schott.) как перспективного источника биологически активных веществ и внедрения нового вида лекарственного растительного сырья (ЛРС) в медицинскую практику Вьетнама.

Степень разработанности темы исследования. Несмотря на то, что некоторые виды ариземы (аризема амурская, аризема красноватая, аризема разнолистная) используются в традиционной китайской медицине (ТКМ), в народной медицине Социалистической Республики Вьетнам (СРВ) и РФ, аризема единокровная не нашла медицинского применения в научной медицине из-за недостаточный изученности химического состава и фармакологических свойств.

Цель настоящего исследования. Целью данной работы является информационно – аналитическое исследование данных литературы о растениях рода *Arisaema* : обоснование перспективности углубленного фармакогностического и фармакологического изучения ариземы единокровной; изучение химического состава сырья, его морфолого – анатомических особенностей; проведение исследований по стандартизации сырья с использованием современных методов анализа для разработки проекта НД и внедрения ариземы единокровной в медицинскую практику Вьетнама.

Постановка задач и выбор средств для их решения. Для осуществления поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Изучить литературу по фармакогностическому анализу, фармакологии, химическому составу, методам анализа основных действующих веществ ариземы единокровной.

2. С помощью качественных реакций и методов хроматографического анализа определить качественный химический состав клубнелуковиц ариземы единокровной.
3. Изучить состав липофильных соединений клубнелуковиц ариземы единокровной.
4. Разработать методики идентификации и количественного определения флавоноидов в сырье.
5. С помощью современных физико-химических методов анализа исследовать качественный состав и определить количественное содержание аминокислот, свободных и связанных сахаров, полисахаридов, дубильных веществ, свободных органических кислот.
6. Разработать методики идентификации и количественного определения сапонинов в сырье ариземы единокровной.
7. Провести оценку острой и хронической токсичности, а так же некоторых видов фармакологической активности изучаемого растения.
8. Исследовать морфологические и анатомо-диагностические признаки клубнелуковиц ариземы единокровной.
9. Определить числовые показатели сырья ариземы единокровной (влажности, золы общей, золы нерастворимой в 10 % растворе хлористоводородной кислоты и экстрактивных веществ).
10. На основе полученных результатов разработать проект фармакопейной статьи на клубнелуковицы ариземы единокровной для включения в ГФ СРВ.

Решение задач осуществлялось путем обобщения данных литературы и проведения экспериментальных исследований.

Научная новизна.

Впервые проведено информационно-аналитическое исследование данных о растениях рода аризема и обоснована перспективность фармакогностического и фармакологического изучения ариземы единокровной.

Проведено фармакогностическое исследование сырья ариземы единокровной с целью изучения химического состава, фармакологических свойств, разработки характеристик подлинности и показателей качества.

Впервые в результате проведенных исследований с использованием методов хроматографии (ТСХ) получены новые данные о качественном составе биологически активных веществ в клубнелуковицах ариземы единокровной: флавоноидов, сапонинов, аминокислот, свободных и связанных сахаров. Изучен состав липофильной фракции и установлено наличие 16 соединений, в том числе: этилового эфира пальмитиновой кислоты, *n*-цимола, ментона, бутановой кислоты, *n*-цетилового спирта, ментола и камфоры. Впервые разработаны методики для клубнелуковиц ариземы единокровной и подобраны условия количественного определения с использованием спектрофотометрического метода флавоноидов, сапонинов. С использованием аминокислотного анализа выявлен качественный и количественный состав аминокислот в клубнелуковицах ариземы единокровной. Обнаружено 19 аминокислот из них 9 – незаменимых. В процессе исследования качественного и количественного состава сахаров в клубнелуковицах ариземы единокровной методом ВЭЖХ установлено, что в качестве свободных сахаров присутствуют фруктоза и глюкоза, а связанные сахара представлены глюкозой, маннозой, ксилозой, галактозой и арабинозой. В клубнелуковицах определено количественное содержание полисахаридов, дубильных веществ и свободных органических кислот.

Выявлены диагностически значимые морфолого-анатомические признаки сырья, позволяющие проводить диагностику клубнелуковиц ариземы единокровной.

Определена острая и хроническая токсичность сырья ариземы единокровной, изучена фармакологическая активность и установлено противовоспалительное, седативное и антидепрессивное действие. Определены числовые показатели: влажность, зола общая, зола не растворимая в 10 % растворе хлористоводородной кислоты, сумма экстрактивных веществ, извлекаемых водой, сумма флавоноидов в пересчете на шафтозид (апигенин 8-С- α -L-арабинозид 6-С- β -D-глюкозид).

Теоретическая значимость работы. Представленный в работе экспериментально - практический материал может служить теоретической базой для исследования и создания лекарственных препаратов на основе лекарственного растительного сырья «Клубнелуковицы ариземы единокровной». Использование

предложенных физико-химических методов анализа позволит систематизировать контроль качества и стандартизацию клубнелуковиц ариземы единокровной.

Практическая значимость работы. На основании проведенных исследований разработаны:

- методики идентификации и количественного определения флавоноидов в клубнелуковицах ариземы единокровной.
- получены экспериментальные данные, подтверждающие эффективность применения изучаемого вида ариземы во Вьетнамской традиционной медицине в качестве противовоспалительного, седативного и антидепрессивного средства.
- результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедры фармакогнозии Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России по теме «Лекарственное растительное сырье, содержащее флавоноиды».
- разработан проект нормативного документа на сырье «Клубнелуковицы ариземы единокровной» для ГФ СРВ с учетом гармонизации требований к качеству сырья, предъявляемых в фармакопеях различных стран и представлен на рассмотрение для включения его в ГФ СРВ.

Методология и методы исследования. Объектами исследования служили клубнелуковицы ариземы единокровной, собранные в стадии цветения, высушенные в естественных условиях (тенева сушка). Методология исследования заключалась в изучении и обобщении литературных данных по теме исследования, оценке степени разработанности и актуальности темы, постановке цели и задач исследования по разработке методик анализа, идентификации и определении содержания сапонинов, флавоноидов и других БАВ ЛРС, формулировании выводов, определяющих теоретическое и практическое значение результатов работы. При выполнении работы были использованы методы хроматографии в тонком слое сорбента, спектрофотометрии, ВЭЖХ, ГХ/МС. Статистическую обработку результатов исследований проводили в соответствии с ГФ XII изд. (ОФС 42-0111-09). Морфолого-анатомический анализ сырья проводили в соответствии с техникой и требованиями, описанными в ГФ СССР XI изд., для изучения фармакологической активности ариземы единокровной использовали общепринятые методики.

Публикации. По теме диссертации опубликовано 12 научных статей, полностью отражающих содержание диссертации; из них 5 статей в изданиях, включенных в «Перечень рецензируемых научных журналов» рекомендованных ВАК РФ.

Степень достоверности результатов. Для получения результатов по качественному и количественному содержанию основных биологически активных веществ (БАВ) были проведены исследования по анализу трех серий лекарственного растительного сырья (в достаточном числе повторностей от 6). Сравнение полученных результатов с применением методов статистической обработки и выборов критериев при фармакологических исследованиях позволяют считать их достоверными.

Апробация диссертации. Основные положения диссертации доложены на пяти научных конференциях: на конференции «V Международный молодежной медицинский конгресс» Санкт-Петербург, 06.12.2013 г; на II научно - практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» Москва, 27.02.2014 г; на «II Всероссийской научной интернет – конференции с международным участием» Казань, 16.12.2014 г; на XXV Московской международной гомеопатической конференции: «Развитие гомеопатического метода в современной медицине» Москва, 23.01.2015 г; на III Научно - практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» Москва, 19.02.2015 г. Апробация диссертации прошла на научной межкафедральной конференции кафедр фармакогнозии, фармацевтической и токсической химии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ, и лаборатории НИИ Фармации Первого МГМУ им. И.М. Сеченова.

Личный вклад автора. При непосредственном участии автора были определены цели и задачи работы, разработаны методические подходы к их выполнению; был проведен сбор, обобщение и анализ литературных данных. Диссертант принимал непосредственное участие при разработке методик идентификации и количественного определения содержания основных групп БАВ в исследуемом объекте. Автору принадлежит ведущая роль при проведении

экспериментальных исследований, статистической обработке и анализе полученных результатов, написании публикаций, докладов и проекта нормативного документа на сырье ариземы единокровной. Диссертация и автореферат написаны лично автором.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 - «Фармацевтическая химия, фармакогнозия». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 2,3 паспорта фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки. Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематикой и планом научно – исследовательских работ ГБОУ ВПО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава РФ (№ государственной регистрации: 01201168237) по научной проблеме «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования».

Основные положения, выносимые на защиту:

- Результаты изучения качественного состава и определения количественного содержания биологически активных веществ (органических кислот, свободных и связанных сахаров, дубильных веществ, флавоноидов, сапонинов, полисахаридов, аминокислот) в сырье ариземы единокровной.
- Результаты изучения фармакологической активности сырья ариземы единокровной.
- Результаты морфолого-анатомического изучения сырья ариземы единокровной.

Объем и структура диссертации. Работа изложена на 150 страницах компьютерного текста, содержит 38 таблиц и 37 рисунков. Работа состоит из введения, обзора литературы, 6 экспериментальных глав, выводов, библиографии из 107 наименований, из которых 23 на иностранных языках, интернет - ресурсов, и приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объектом исследования является аризема единокровная (*Arisaema consanguineum* Schott.), распространенная на территории СРВ и в Индии, Китае, Таиланде.

Исследования проводили на образцах, заготовленных в национальном парке Ханг Лиен (окрестности г. Шапа, провинция Лаокай, Вьетнам). Сырьем служили высушенные клубнелуковицы ариземы единокровной, собранные в июле – августе 2012 – 2013 гг., в период цветения растения и в конце вегетации. Лекарственное растительное сырье сушили в тени, в хорошо проветриваемом помещении или в сушилке при температуре 50°C.

При проведении анализа нами использованы классические и современные методы исследований: хроматография в тонком слое (ТСХ), капиллярный электрофорез (прибор Applied Biosystem 273 Т, США), газовая хромато-масс-спектрометрия (ГХ/МС) с использованием газового хроматографа 7890 с масс-селективным детектором 5975 фирмы Agilent Technologies (США), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) на хроматографе Waters Acquility с tandemным квадрупольным МС-детектором TQD (Waters) (США), спектрофотометрия Cary 50 scan (США), титриметрия, гравиметрия, современные методики фармакологических исследований, макроскопический и микроскопический анализ. В процессе исследований использованы реактивы, стандарты, растворители, отвечающие требованиям соответствующей нормативной документации. Статистическую обработку экспериментальных данных проводили по общепринятым методикам.

Определение основных групп БАВ

С помощью качественных реакций доказано наличие в сырье ариземы единокровной: сапонинов, флавоноидов, полисахаридов, дубильных веществ.

Определение состава липофильной фракции

Для исследования состава липофильной фракции было получено извлечение спиртовое (спирт 96 %) из клубнелуковиц ариземы единокровной, которое изучали посредством метода газовой хромато-масс-спектрометрии.

В результате проведенных исследований в спиртовом извлечении клубнелуковиц ариземы единокровной идентифицированы 16 соединений липофильного характера: спирты, эфиры, фенолы, терпеноиды и др. По относительному количественному содержанию (%) преобладающими (мажорными) компонентами оказались: этиловый эфир пальмитиновой кислоты (41,85), *n*-цимол (10,41), ментон (9,14), бутановая кислота (5,70), *n*-цетиловый спирт (5,01), *n*-мент-3-ен (4,72), ментол (4,32) и камфора (3,54).

Определение количественного содержания дубильных веществ

Содержание дубильных веществ определяли методом перманганатометрии по методике ГФ XI.

Полученные данные свидетельствуют о том, что содержание дубильных веществ в пересчете на танин в клубнелуковицах ариземы единокровной составляет в среднем $1,14 \% \pm 0,01 \%$.

Определение содержания полисахаридов

Количественное определение содержания полисахаридов проводили по методике статьи 20 «*Листья подорожника большого*», ГФ XI.

Установлено, что в клубнелуковицах ариземы единокровной содержание полисахаридов составляет $12,00 \pm 0,46 \%$.

Определение содержания свободных органических кислот

Количественное определение содержания свободных органических кислот в пересчете на кислоту яблочную проводили по методике статьи 38 «*Плоды шиповника*», ГФ XI.

Таким образом, в ходе исследования установлено, что подземные органы ариземы единокровной содержат $4,43 \pm 0,06 \%$ органических кислот в пересчете на кислоту яблочную и абсолютно сухое сырье.

Определение содержания суммы свободных и связанных сахаров

Качественный и количественный состав сахаров в сырье ариземы единокровной устанавливали методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Проведено определение содержания свободных и связанных сахаров. Свободные сахара представлены глюкозой (0,34%) и фруктозой (0,30%) (Рис.1,2.).

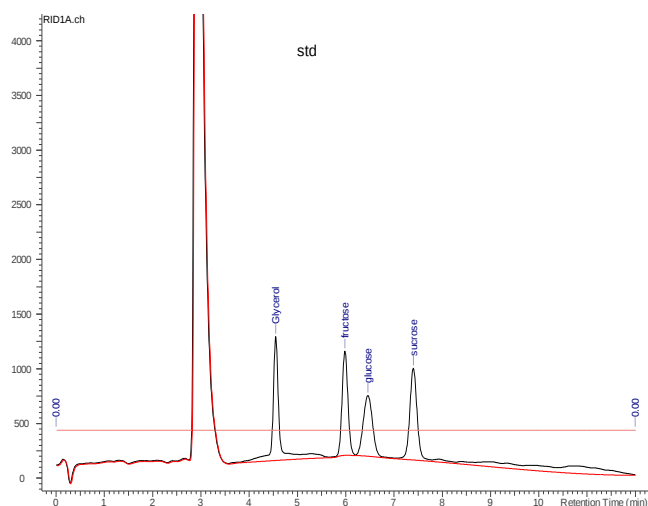


Рис.1. Хроматограмма смеси стандартов 10 г/л.

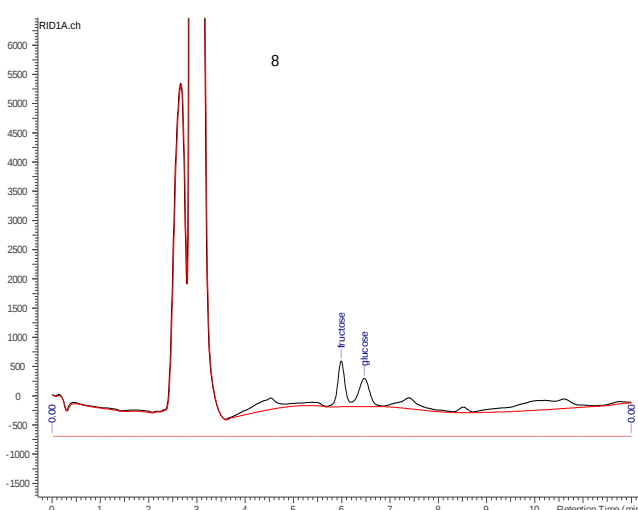


Рис.2. Хроматограмма водного извлечения из клубнелуковиц ариземы единокровной.

В составе связанных сахаров присутствуют: глюкоза (13,67%), манноза (0,46%), ксилоза (0,42%), галактоза (0,42%) и арабиноза (0,09%) (Рис.3,4.). Общая сумма свободных сахаров в сырье составляет 0,67 %, связанных 15,06%.

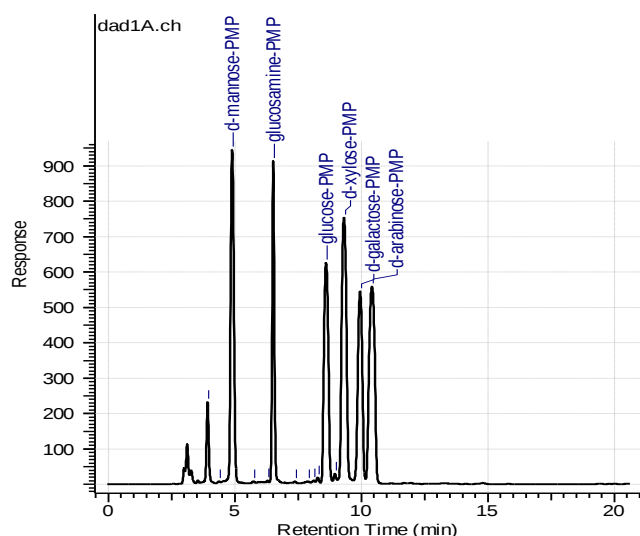


Рис.3. Хроматограмма смеси стандартов (1г/л).

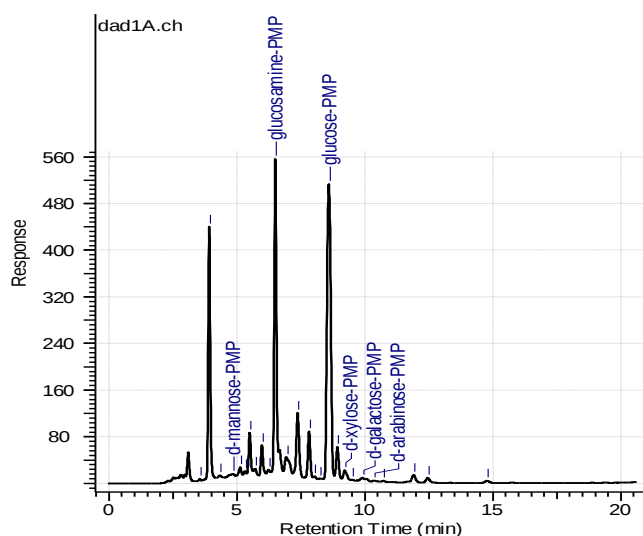


Рис.4. Хроматограмма продуктов гидролиза водного извлечения из клубнелуковиц ариземы единокровной.

Определение содержания флавоноидов

Идентификации флавоноидов в сырье ариземы единокровной

методом ТСХ и ВЭЖХ/МС.

Методом ТСХ в исследуемом сырье было обнаружено не менее 5 соединений, одно из которых по хроматографическому поведению было идентифицировано с шафтозидом.

На основании проведенных исследований с помощью метода ВЭЖХ/МС в клубнелуковицах ариземы единокровной установлено наличие более 11-ти соединений флавоноидной природы (шафтозид, изошафтозид, неошафтозид, виценин 2, хризоериол 6-С-глюкозид-8-С-арабинопиранозид, кемферид и тд.) и глюкозамина.

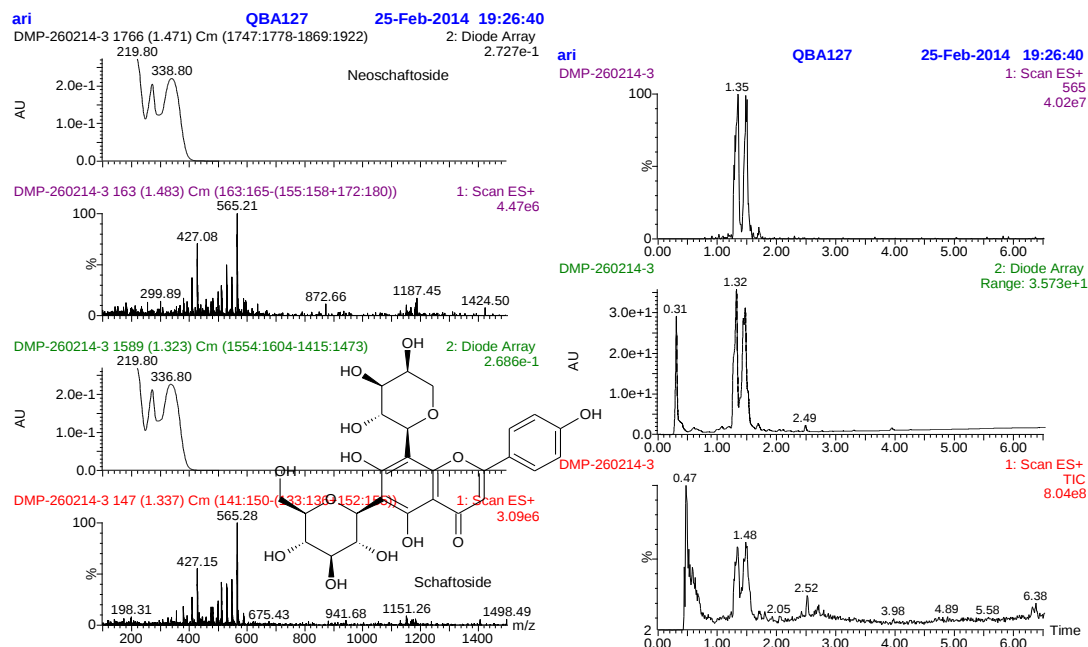
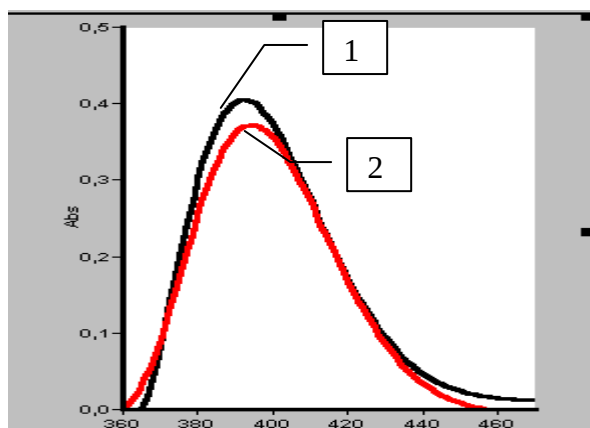


Рис.5. ВЭЖХ/МС извлечения (70 % спирт) из клубнелуковиц ариземы единокровной

Количественное определение суммы флавоноидов спектрофотометрическим методом

Для разработки методики количественного определения флавоноидов были сняты спектры поглощения продуктов реакции шафтозида с алюминия хлоридом и извлечения из клубнелуковиц ариземы единокровной с концентрированной хлористоводородной кислотой на регистрирующем спектрофотометре Cary 50.



- 1 – 0,02 % раствора шафтозида в подкисленном спирте 95 %;
- 2 – продукт реакции спиртового извлечения (спирт 95 %) из сырья с 2 % раствором алюминия хлорида в спирте 95 % .

Рис.6. Спектр поглощения продуктов реакции извлечения из клубнелуковиц ариземы единокровной с 2 % раствором алюминия хлорида в спирте 95 %

Спектр раствора шафтозида имеет максимум поглощения при длине волны 392 нм. Спектр поглощения продуктов реакции флавоноидов извлечения из клубнелуковиц ариземы единокровной с 2 % раствором алюминия хлорида в спирте 95 % совпадает со спектром поглощения шафтозида. Максимум окраски достигается через 30 мин после чего она сохраняется неизменной в течение 20 мин.

Был построен калибровочный график. Установлено, что калибровочная кривая зависимости оптической плотности, измеренной при длине волны 392 нм, и концентрацией раствора шафтозида носит линейный характер в интервале концентраций от 0,005% до 0,06%. Наименьшее определяемое количество шафтозида 0,5 мг/мл. Был рассчитан удельный показатель поглощения продуктов реакции шафтозида с 2% спиртовым раствором алюминия хлорида равный 166,13.

Оптимальными условиями извлечения флавоноидов из сырья ариземы единокровной являются: экстрагент – спирт 95 %, подкисленный HCl, соотношение сырья и экстрагента 1:20, измельченность сырья – 1-2 мм, нагревание на кипящей водной бане в течение 60 мин, двукратная экстракция .

С помощью разработанной методики проведено количественное определение содержание флавоноидов в клубнелуковицах ариземы единокровной. Результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Результаты определения содержания флавоноидов в клубнелуковицах ариземы единокровной

Партия	Партия 1	Партия 2	Партия 3
Содержание флавоноидов, %	0,21	0,20	0,20
	0,22	0,18	0,21
	0,23	0,19	0,20
	0,24	0,20	0,19
	0,25	0,21	0,20
	0,23	0,21	0,20
Метрологическая характеристика.	$\bar{x} = 0,23$	$\bar{x} = 0,20$	$\bar{x} = 0,20$
	$S_{\bar{x}} = 0,004$	$S_{\bar{x}} = 0,004$	$S_{\bar{x}} = 0,002$
	$\Delta_{\bar{x}} = 0,01$	$\Delta_{\bar{x}} = 0,01$	$\Delta_{\bar{x}} = 0,005$
	$A = 4,3$	$A = 5,0$	$A = 2,5$
	$P = 95 \%$	$P = 95 \%$	$P = 95 \%$

Содержание флавоноидов в клубнелуковицах ариземы единокровной колеблется от 0,18 % до 0,25 %.

Определение содержания сапонинов

Определение сапонинов методом ТСХ.

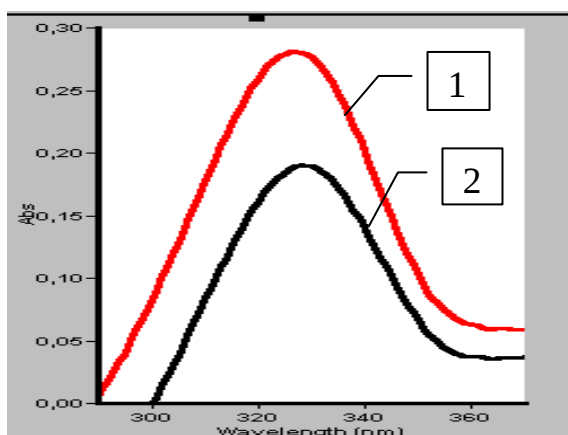
Методом ТСХ в исследуемом сырье было обнаружено не менее 4 соединений, одно из которых по хроматографическому поведению было идентифицировано с эсцином.

Количественное определение суммы сапонинов

спектрофотометрическим методом

В основу разработанной методики была положена работа Борисовой Д.А., в которой была установлена зависимость оптической плотности от концентрации эсцина, определена устойчивость оптической плотности во времени и рассчитан удельный показатель поглощения продуктов взаимодействия эсцина с концентрированной серной кислотой. Удельный показатель поглощения равен 222,45.

Для разработки методики количественного определения сапонинов были сняты спектры поглощения продуктов реакции эсцина и извлечения из клубнелуковиц ариземы единокровной с концентрированной серной кислотой на регистрирующем спектрофотометре Cary 50.



1 – 0,015 % раствора эсцина в 70 %
спирте;
2 – 95 % спиртовое извлечение из
сырья ариземы единокровной.

Рис.7. Спектр поглощения продуктов реакции извлечения из клубнелуковиц ариземы единокровной с кислотой серной концентрированной

Спектр спиртового раствора эсцина имеет максимум поглощения при длине волны 328 нм. Спектр поглощения продуктов реакции сапонинов извлечения из клубнелуковиц ариземы единокровной (спирт 95 %) с концентрированной серной кислотой совпадает со спектром поглощения продуктов реакции эсцина с концентрированной серной кислотой.

Оптимальными условиями извлечения сапонинов из сырья ариземы единокровной являются: экстрагент – 95 % спирт, соотношение сырья и экстрагента 1:100, измельченность сырья – 1-2 мм, нагревание на кипящей водной бане 60 мин, двукратная экстракция.

С помощью разработанной методики проведено определение количественного содержания сапонинов в клубнелуковицах ариземы единокровной. Результаты представлены в таблице 2.

Таблица 2.

Результаты определения содержания сапонинов в сырье ариземы единокровной

Партия	Партия 1	Партия 2	Партия 3
Содержание сапонинов, %	1,07	1,16	0,87
	1,05	1,15	0,84
	1,06	1,15	0,88
	1,08	1,16	0,88
	1,05	1,15	0,85
	1,06	1,14	0,84
Метрологическая характеристика.	$\bar{x} = 1,06$	$\bar{x} = 1,15$	$\bar{x} = 0,86$
	$S_{\bar{x}} = 0,02$	$S_{\bar{x}} = 0,02$	$S_{\bar{x}} = 0,008$
	$\Delta_{\bar{x}} = 0,05$	$\Delta_{\bar{x}} = 0,05$	$\Delta_{\bar{x}} = 0,02$
	A = 4,71 %	A = 4,46 %	A = 2,39 %
	P = 95 %	P = 95 %	P = 95 %

Из таблицы видно, что содержание сапонинов в клубнелуковицах ариземы единокровной колеблется от 0,84 % до 1,16 %.

Определение содержания аминокислот

Определение аминокислот проводили на аминокислотном анализаторе . Результаты качественного и количественного определения аминокислот в клубнелуковицах ариземы единокровной представлены на рис 8.

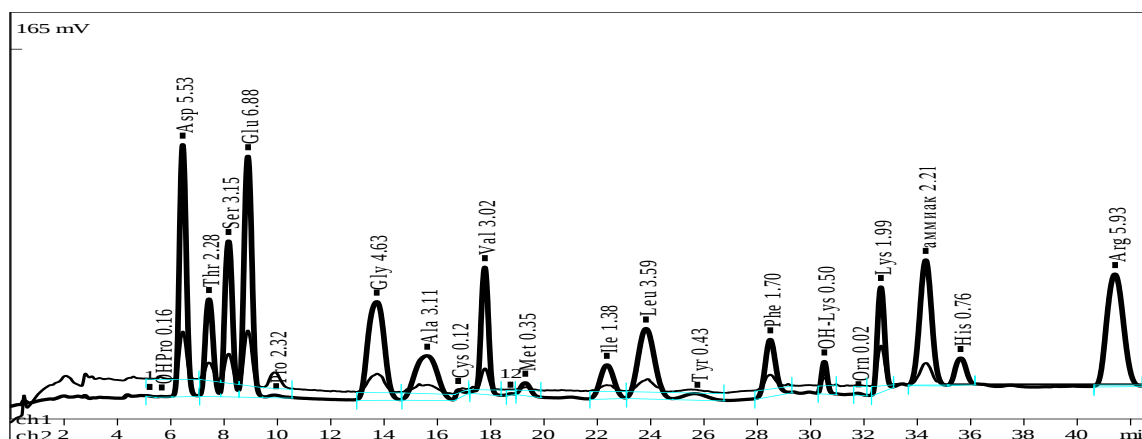


Рис.8. Хроматограмма спиртового извлечения (70% спирт) из клубнелуковиц ариземы единокровной.

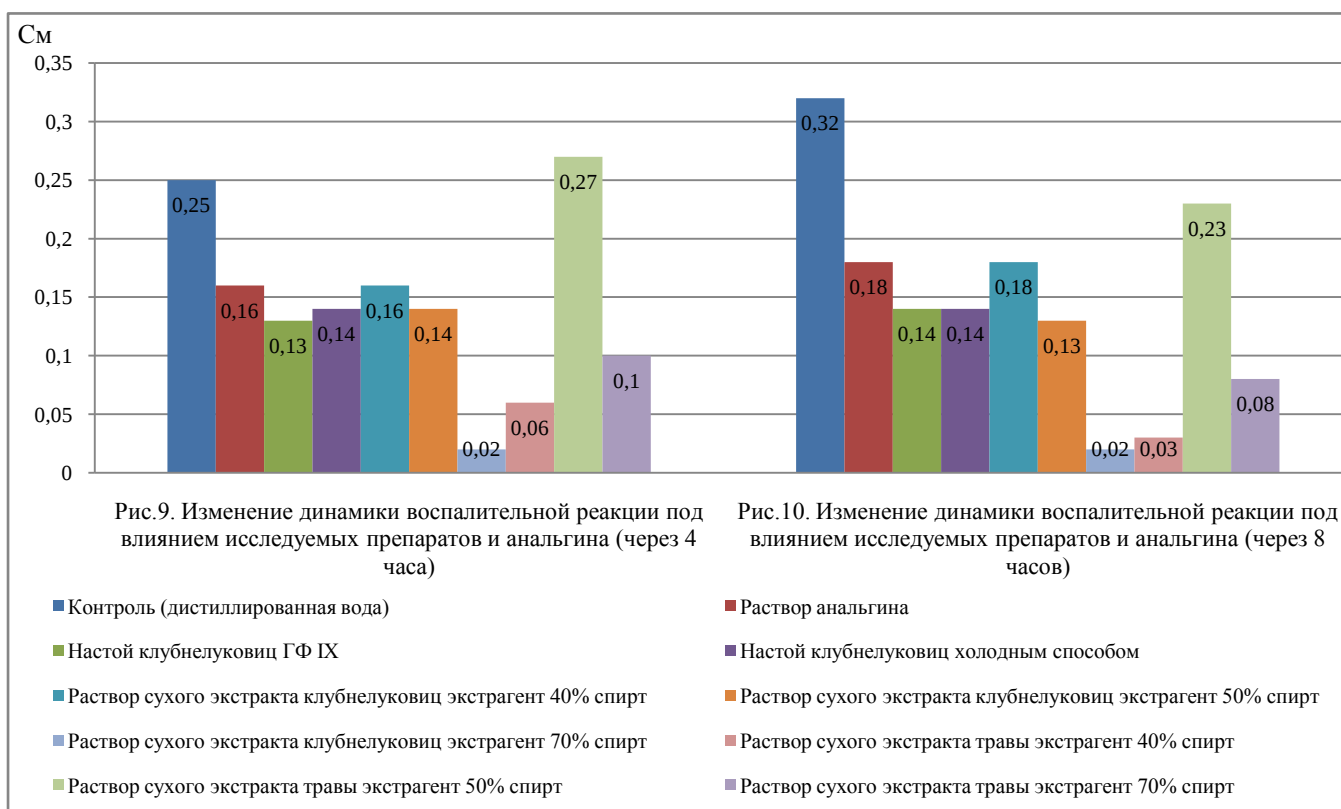
Согласно полученным данным (рис.8), в клубнелуковицах ариземы единокровной содержится 19 аминокислот (OH-Pro, Asp, Ser, Glu, Pro, Gly, Ala, Cys, Tyr, OH-Lys) из них 9 незаменимых (Thr, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Lys, His, Arg). Суммарное аминокислот в сырье составляет 5,2 %. Преобладающими в сумме свободных и связанных аминокислот являются аргинин 16,32 %, глутаминовая кислота 16,0 %, аспарагиновая кислота 11,62 % , лейцин 7,45 %, валин 5,6 %, глицин 5,48 %.

Изучение фармакологической активности сырья ариземы единокровной

При изучении острой и хронической токсичности водных настоев и растворов сухих экстрактов (экстрагент 70 %, 50 % и 40 % спирт) из сырья ариземы единокровной было установлено, что по классификации Сидорова К. К., водные настои клубнелуковиц относятся к классу относительно безвредных веществ, растворы сухих экстрактов из сырья ариземы единокровной относятся к классу малотоксичных веществ. Доказана низкая токсичность исследованных препаратов при их курсовом применении.

Изучение противовоспалительной активности

Проводилось на модели «острого воспалительного отека лапы крысы, вызванного введением формалина».



Результаты представлены на рис.9 и рис.10. Установлена противовоспалительная активность исследуемых препаратов из сырья ариземы единокровной. Максимальное снижение отека лапы отмечалось при использовании раствора сухого экстракта клубнелуковиц (экстрагент 70 % спирт) - 6,25 % и раствора сухого экстракта травы (экстрагент 40 % спирт) - 9,37 % (% прироста отека по сравнению с контролем).

Изучение седативной активности

Определяли на модели «Открытое поле». Полученные результаты представлены в табл.3.

Таблица 3.

Влияние водных настоев, растворов сухого экстракта сырья ариземы единокровной на двигательную активность животных.

№	Вариант опыта	Уменьшение двигательной активности животных, %
1	Экстракт валерианы	43
2	Настой клубнелуковиц ГФ IX	43
3	Настой клубнелуковиц холодным способом	28
4	Раствор сухого экстракта клубнелуковиц экстрагент 40 % спирт	71
5	Раствор сухого экстракта клубнелуковиц экстрагент 50 % спирт	43
6	Раствор сухого экстракта клубнелуковиц экстрагент 70 % спирт	43
7	Раствор сухого экстракта травы экстрагент 40 % спирт	57
8	Раствор сухого экстракта травы экстрагент 50 % спирт	28
9	Раствор сухого экстракта травы экстрагент 70 % спирт	57

Согласно результатам всех серий эксперимента (табл.3.), все образцы тестируемого ЛРС вызвали снижение двигательной активности животных. В группе животных, получавших раствор сухого экстракта клубнелуковиц (экстрагент 40 % спирт) установлено максимальное снижение двигательной активности - 71 %. В группе животных, получавших настой клубнелуковиц холодным способом и раствор сухого экстракта травы (экстрагент 50 % спирт) отмечалось минимальное снижение двигательной активности - 28 %.

Следует отметить, что полученный нами препарат сухого экстракта клубнелуковиц (экстрагент 40 % спирт) обладает более выраженной седативной активностью по сравнению с экстрактом валерианы.

Изучение антидепрессивной активности

ЛРС оценивали на крысах с использованием теста «Отчаяние», изучая поведенческую беспомощность животных, т.е. естественную реакцию животных при попадании в угрожающие жизни условия.

Таблица 4.

Влияние водного настоя, растворов сухих экстрактов сырья ариземы единокровной на поведение животных в тесте «Отчаяние»

№	Вариант опыта	Количество активных попыток	Количество пассивных попыток	Количество попыток выбраться из воды
1	Контроль (вода)	8,5±0,27	5,3±0,14	0,5±0,02
2	Деприм	27,6±0,32	0,6±0,02	2,4±0,04
3	Настой клубнелуковиц ГФ IX	15,4±0,22	2,4±0,07	2,6±0,05
4	Настой клубнелуковиц (холодным способом)	14,0±0,28	2,4±0,06	1,0±0,04
5	Раствор сухого экстракта (клубнелуковиц экстрагент 40 % спирт)	35,5±0,33	0	3,2±0,08
6	Раствор сухого экстракта (клубнелуковиц экстрагент 50 % спирт)	26,8±0,28	0	2,4±0,07
7	Раствор сухого экстракта (клубнелуковиц экстрагент 70 % спирт)	33,0±0,32	0	4,2±0,08
8	Раствор сухого экстракта (травы экстрагент 40 % спирт)	36,2±0,34	0	4,8±0,11
9	Раствор сухого экстракта (травы экстрагент 50 % спирт)	34,2±0,31	0	3,6±0,06
10	Раствор сухого экстракта (травы экстрагент 70 % спирт)	36,2±0,34	0	2,4±0,04

Как видно из полученных данных (табл.4.), под действием исследуемых препаратов существенно увеличивалось время активных попыток животных выбраться из воды. Так, сухие экстракты клубнелуковиц и травы (экстрагент 70 %, 50 % и 40 % спирт) увеличивали антидепрессивный эффект почти в 4 раза по сравнению с контролем и настои из клубнелуковиц увеличивали почти в 2 раза по сравнению с контролем, т.е. настои из клубнелуковиц и сухие экстракты клубнелуковиц и травы ариземы единокровной (экстрагент 70 %, 50 % и 40 % спирт) обладали антидепрессивным эффектом. Действие сухих экстрактов было сопоставимо с действием препарата «Деприм», настои из клубнелуковиц несколько уступали по антидепрессивному действию препарату «Деприм».

Морфолого-анатомическое изучение и определение числовых показателей сырья

Проведено изучение внешних признаков сырья и установлено, что наиболее характерными являются следующие признаки: клубнелуковицы шаровидной, слегка приплюснутой формы диаметром 5-10 см. В верхней части имеется углубление с чешуевидными остатками листьев, нижняя часть выпуклая, места прикрепления корней и их остатки располагаются по кругу выше периметра клубнелуковицы. Цвет снаружи светло-коричневый, на изломе – беловато-кремовый. Запах слабый, специфический. Вкус жгучий, раздражающий.

Микроскопический анализ выявил общие признаки, характеризующие клубнелуковицы ариземы единокровной: наличие пучкового строения, гиподермы, игольчатых кристаллов оксалата кальция в виде рафид, сферокристаллов часто шаровидной формы, крахмальных зерен и клеток – идиобластов со слизью.

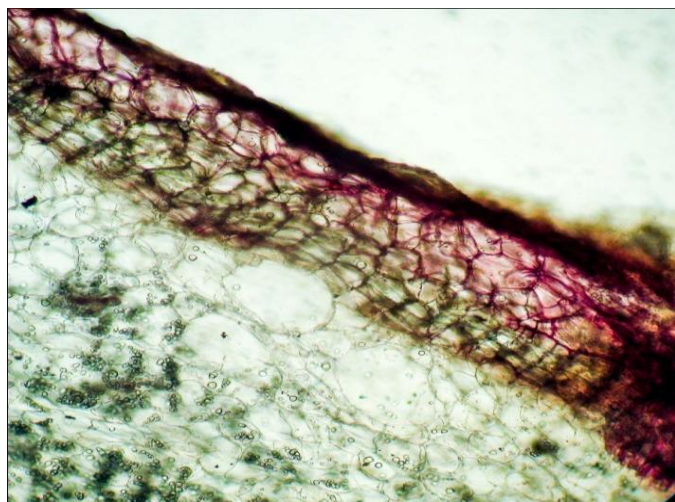


Рис.11. Поперечный срез клубнелуковицы ариземы единокровной. Гиподерма. Реакция с флороглюцином. Ув.х100.

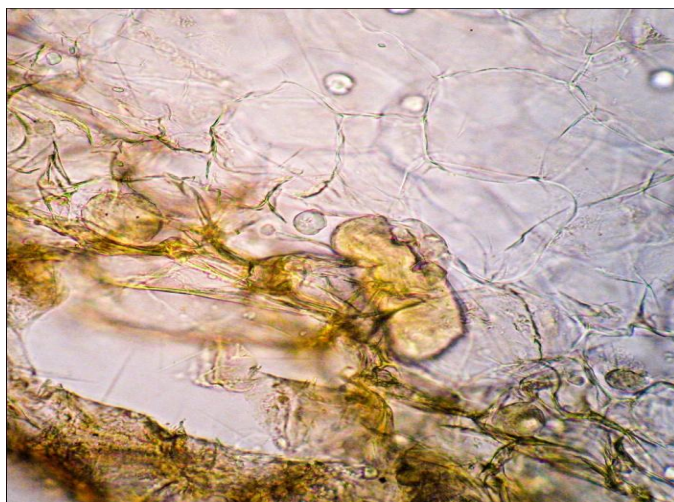


Рис.12. Поперечный срез клубнелуковицы ариземы единокровной. Гиподерма с маслянистыми каплями. Реакция с суданом III. Ув.х400

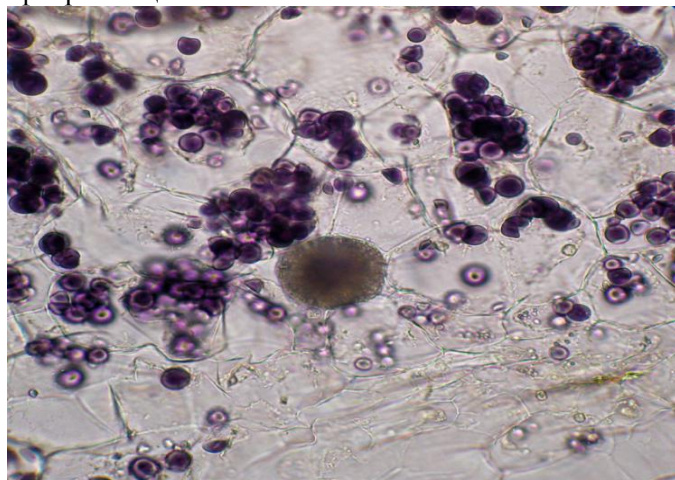


Рис.13. Поперечный срез клубнелуковицы ариземы единокровной. Крахмальные зерна и сферокристалл. Реакция с р-вом Люголя. Ув.х400.

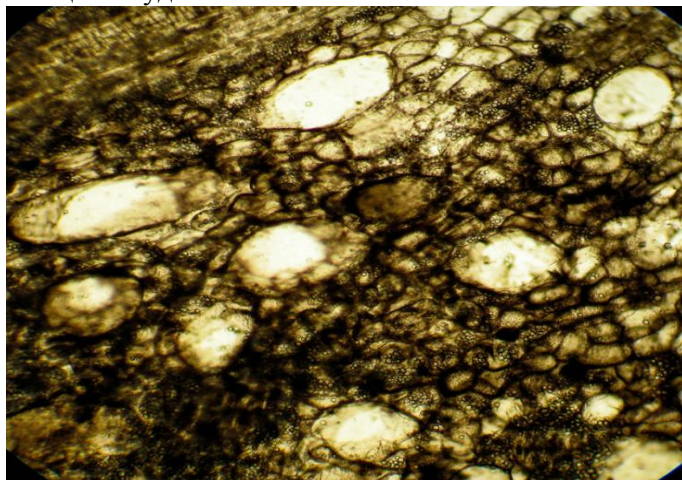


Рис.14. Поперечный срез клубнелуковицы ариземы единокровной. Клетки со слизью. Реакция с тушью. Ув.х100.

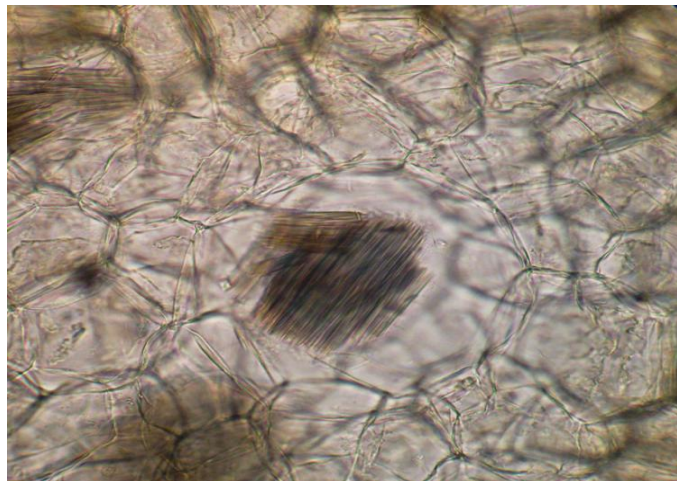


Рис.15. Поперечный срез клубнелуковицы ариземы единокровной. Рафиды оксалата кальция. Ув.х400

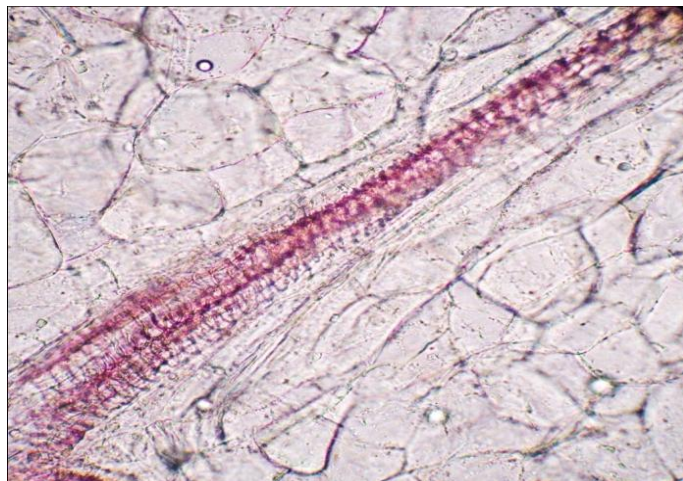


Рис.16. Поперечный срез клубнелуковицы ариземы единокровной. Сосуды ксилемы проводящих пучков Ув.х400

Проведено определение влажности сырья ариземы единокровной, золы общей, золы нерастворимой в 10 % растворе хлористоводородной кислоты и экстрактивных веществ, извлекаемых водой, спиртом 40 %, спиртом 70 %, спиртом 95 %.

Результаты проведенных исследований позволяют рекомендовать в качестве числовых показателей для сырья ариземы единокровной: влажность не более 10 %, общая зола не более 5 %, зола, нерастворимая в 10 % растворе хлористоводородной кислоты, не более 1 %, экстрактивных веществ, извлекаемых водой не менее 25 %.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Анализ литературных источников показал, что сырье ариземы единокровной широко используется в народной медицине Вьетнама и является актуальной проблемой для изучения фармакологических свойств и химического состава, разработки методик анализа основных действующих веществ с использованием современных методов и последующего внедрением их в нормативную документацию.
2. С помощью качественных реакций доказано наличие в сырье ариземы единокровной сапонинов, флавоноидов, полисахаридов, дубильных веществ.
3. В результате проведенных исследований липофильной фракции сырья посредством метода газовой хромато-масс-спектрометрии в спиртовом экстракте

- клубнелуковиц ариземы единокровной идентифицированы 16 соединений липофильного характера: спирты, эфиры, фенолы, терпеноиды и др. Найдено, что доминирующими компонентами липофильной фракции являются этиловый эфир пальмитиновой кислоты (41,85 %), *n*-цимол (10,41 %) и ментон (9,14 %).
4. Методом ВЭЖХ в клубнелуковицах ариземы единокровной установлено наличие 11 флавоноидных соединений, с помощью масс - спектрометрии определено их химическое строение (шафтозид, изошафтозид, неошафтозид, виценин 2, и др.). Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов методом спектрофотометрии. В клубнелуковицах ариземы единокровной сумма флавоноидов в пересчете на шафтозид колеблется от 0,18 % до 0,25 %.
5. В клубнелуковицах ариземы единокровной установлено наличие 19 аминокислот из них 9 незаменимых. В количественном отношении аминокислоты в клубнелуковицах составляют 5,2 %. Преобладающими в сумме свободных аминокислот являются аргинин 16,32 %, глутаминовая кислота 16,0 %, аспарагиновая кислота 11,62 % , лейцин 7,45 %, валин 5,6 %, глицин 5,48 %. Проведено определение содержания свободных и связанных сахаров. Общая сумма свободных сахаров в сырье составляет 0,67 %, связанных 15,06%. Установлено, что в клубнелуковицах ариземы единокровной содержатся $1,14 \pm 0,01$ % дубильных веществ в пересчете на танин; $12,00 \pm 0,46$ % полисахаридов и $4,53 \pm 0,06$ % суммы органических кислот в пересчете на кислоту яблочную.
6. Проведена идентификация сапонинов в сырье методом ТСХ. Подобраны условия и разработана методика количественного определения сапонинов, в основу которой положен спектрофотометрический метод после проведения реакции с серной кислотой концентрированной. В качестве стандарта использован эсцин. Сравнительными исследованиями установлено количественное содержание сапонинов в сырье ариземы единокровной: от 0,84 % до 1,16 %.
7. При изучении острой и хронической токсичности водных настоев и растворов сухих экстрактов (экстрагент 70 %, 50 % и 40 % спирт) сырья ариземы единокровной было установлено, что по классификации Сидорова К. К., водные

настои клубнелуковиц относятся к классу относительно безвредных веществ (LD_{50} более 5000 мг/кг), растворы сухих экстрактов из сырья ариземы единокровной относятся к классу малотоксичных веществ (LD_{50} 101-1000 мг/кг). Доказана низкая токсичность исследованных препаратов при их курсовом применении.

8. Установлена противовоспалительная активность клубнелуковиц и травы ариземы единокровной. Доказано, что раствор сухого экстракта клубнелуковиц (экстрагент 70 % спирт) и раствор сухого экстракта травы (экстрагент 40 % спирт) обладают максимальным противовоспалительным действием. Экспериментально показано, что раствор сухого экстракта клубнелуковиц (экстрагент 40 % спирт) в дозе 300 мг/кг, вызывают максимальный седативный эффект у подопытных животных (71 %). Наибольший интерес для разработки суммарного экстракционного препарата клубнелуковиц ариземы единокровной представляет сухой экстракт клубнелуковиц (экстрагент 40 % спирт), проявляющий антидепрессивную и седативную активность, а также обладающий противовоспалительным действием.

9. Проведено изучение внешних признаков сырья и установлено, что наиболее характерными являются следующие признаки: приплюснутая форма клубнелуковиц, наличие на верхушке чешуевидных остатков листьев и кольцообразно расположенных мест прикрепления корней.

Определены анатомо-диагностические признаки клубнелуковиц ариземы единокровной с применением гистохимических реакций и биометрических характеристик. Выявлены и визуализированы диагностические признаки: строение проводящих пучков, клеток паренхимы, наличие игольчатых кристаллов оксалата кальция в виде рафид, сферокристаллов, форма и размер крахмальных зерен, а так же наличие клеток - идиобласт со слизью.

10. Проведено определение влажности сырья ариземы единокровной, золы общей, золы нерастворимой в 10 % растворе хлористоводородной кислоты и экстрактивных веществ, извлекаемых водой, спиртом 40 %, спиртом 70 %, спиртом 95 %. Результаты проведенных исследований позволяют рекомендовать в качестве числовых показателей для сырья ариземы единокровной: суммы

флавоноидов не менее 0,18 %, экстрактивных веществ, извлекаемых водой не менее 25 %, влажность не более 10 %, содержание общей золы не более 5 %, содержание золы, нерастворимой в 10 % растворе хлористоводородной кислоты, не более 1 %.

11. Разработан гармонизированный проект Фармакопейной статьи на клубнелуковицы ариземы единокровной, который направлен на рассмотрение для включения его в ГФ СРВ.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Нгуен Тхи Ким Нган.** Род *Arisaema* - перспективный источник новых фитопрепаратов // Тезисы V международного молодежного медицинского конгресса. – Санкт-Петербург. – 2013. – С. 359.
2. **Нгуен Тхи Ким Нган**, Морохина С.Л., Ермакова В.А. Определение острой и хронической токсичности ариземы единокровной // Сеченовский вестник. – 2014. – № 1. – С. 135 – 136.
3. **Нгуен Тхи Ким Нган**, В.А. Ермакова. Аминокислотный состав ариземы единокровной // **Фармация.** – 2014. – № 8. – С. 14 – 15.
4. В.А. Ермакова, **Нгуен Тхи Ким Нган**, Т.Ю. Ковалева, Н.В. Бобкова Растения рода *аризема* – перспективные источники лекарственного сырья // **Традиционная медицина.** – №2, – 2014. – С.43 – 53.
5. **Нгуен Тхи Ким Нган**, В.А. Ермакова. Определение качественного состава и количественного содержания углеводов в корневищах ариземы единокровной // Состояние и перспективы оптимизации и эффективности в фармакогнозии, технологии, клинике. Ярославль. – 2014. – С. 148 – 151.
6. **Нгуен Тхи Ким Нган**, Д.В. Курилов, В.А. Ермакова, И.А. Самылина. Состав липофильной фракции корневищ ариземы единокровной // **Воронежского государственного университета вестник.** Сер. Химия. Биология. Фармация. – 2014. – № 4. – С. 131 – 134.
7. **Nguyen Thi Kim Ngan**, D.M Popov, V.A. Ermakova, I.A. Samylina. Analysis of saponins in the rhizomes *arisaema consanguineum* // *Journal of practical medicine Viet Nam.* – 2014. – № 10. – P.70 – 72.

8. **Нгуен Тхи Ким Нган**, Морохина С.Л., Ермакова В.А. Изучение седативного эффекта корневищ ариземы единокровной // Сборник материалов XXV Московской международной гомеопатической конференции «Развитие гомеопатического метода в современной медицине». – М: Московский гомеопатический центр. – 2015. – С. 71 – 72.
9. Бобкова Н.В., **Нгуен К.Н.**, Ермакова В.А. Микроскопическое исследование клубнелуковиц ариземы единокровной (*Arisaema consanguineum* (L.) Schott.) //Ботаника и природное многообразие растительного мира «II Всероссийская научная Интернет – конференция с международным участием». – Казань, – 2015. – С.24 – 28.
10. **Нгуен Тхи Ким Нган**, Морохина С.Л., Ермакова В.А. Фармакологическая активность извлечений из сырья ариземы единокровной // **Фармация.** – 2015. – № 3. С. 43 – 46.
11. **Нгуен Тхи Ким Нган**, Морохина С.Л., Ермакова В.А. Изучение противовоспалительной активности ариземы единокровной // Сеченовский вестник.–2015.– № 1.– С. 116 – 117.
12. **Нгуен Тхи Ким Нган**, Н.В. Бобкова, Ермакова В.А. Определение характеристик подлинности клубнелуковиц ариземы единокровной // **Фармация.** – 2015. – № 5. – С. 11 – 14.