

На правах рукописи

Иванова Дина Фирусовна

**ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ, РАЗРАБОТКА
И СТАНДАРТИЗАЦИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ
НА ОСНОВЕ ПЕРВОЦВЕТА ВЕСЕННЕГО (*PRIMULA VERISL.*)**

14.04.02 - фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Самара- 2018

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

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор *Латыпова Гузель Минулловна*

Официальные оппоненты:

Нестерова Ольга Владимировна – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), кафедра общей химии, заведующий кафедрой

Бахарев Владимир Валентинович – доктор химических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный технический университет» Министерства образования и науки Российской Федерации, факультет пищевых производств, декан факультета

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Пермь

Защита состоится «__» _____ 2018 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б.

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

Автореферат разослан «__» _____ 2018 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор фармацевтических наук,
доцент

Петрухина Ирина Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одним из приоритетных научных направлений, определенных «Стратегией развития медицинской науки в Российской Федерации на период до 2025 года», является профилактика хронических неинфекционных заболеваний (ХНИЗ) для снижения смертности населения Российской Федерации. В России ХНИЗ, включающие в себя сердечно-сосудистые заболевания, онкологические и хронические респираторные заболевания, а также сахарный диабет, являются причиной 75% всех причин смерти населения. Это обстоятельство делает проблему ХНИЗ для нашей страны особенно актуальной. Профилактика и контроль ХНИЗ требуют реализации широкого ряда многоуровневых и межсекторальных мер, направленных на весь спектр ХНИЗ с целью создания необходимых условий эффективной фармакотерапии и здорового образа жизни (Шальнова С.А., Концевая А.М., 2012). К основным факторам риска, приводящих к возникновению ХНИЗ, относятся артериальная гипертензия, гиперхолестеринемия, нерациональное питание, гиподинамия и др. В комплексном лечении и профилактике многих ХНИЗ могут широко применяться лекарственные растительные препараты (ЛРП), специализированные пищевые продукты с растительными экстрактами, биологически активные добавки к пище (БАД). ЛРП оказывают системное воздействие на организм (что важно для лечения хронических заболеваний), обеспечивая клинический эффект с минимумом побочных реакций (Киселева Т.Л. и др., 2008; Куркин В.А., 2016; Самылина И.А. и др., 2003, 2010). В связи с этим разработка средств комплексной профилактики и лечения ХНИЗ на основе растительного сырья, содержащего богатый комплекс биологически активных соединений (БАС), является актуальным направлением.

К перспективным источникам получения как гидрофильных, так и липофильных соединений относятся растения рода *Primula*L. Наиболее изученным, широко распространенным на территории РФ, в том числе Республике Башкортостан, является первоцвет весенний (лекарственный) [*Primulaveris*L. или *P. officinalis* (L.)Hill.]. В зарубежной медицинской практике разрешены к применению корневища с корнями, цветки первоцвета весеннего, в Российской Федерации (РФ) – листья в качестве пищевого растительного сырья. Известны следующие фармакологические свойства препаратов из первоцвета весеннего: отхаркивающее, бронхолитическое, потогонное, мочегонное, спазмолитическое, антимикробное (Киселева Т.Л. и др., 2008; Куркин В.А., 2016; ГРЛС, 2017). В экспериментальных исследованиях у травы первоцвета весеннего выявлены антигипоксанта, антиоксидантная, ангиопротекторная, эндотелиопротекторная активности (Латыпова Г.М., 2015). На фармацевтическом рынке РФ присутствуют зарубежные ЛРП на основе данного растения, используемые преимущественно в качестве отхаркивающих, бронхолитических средств и БАД к пище в качестве дополнительных источников пищевых веществ, используемых для коррекции ряда гинекологических заболеваний. Однако вновь выявленные фармакологические свойства изучаемого растения

позволяют расширить область применения и возможность его использования в медицинской практике, в том числе при ХНИЗ. Несмотря на широкое применение ЛРП и БАД к пище на основе первоцвета весеннего в медицинской и фармацевтической практике, отечественные препараты на его основе до сих пор не созданы.

Таким образом, актуальным является фармакогностическое исследование первоцвета весеннего, направленное на исследование сырья и экстрактов, с целью разработки рациональных лекарственных форм.

Степень разработанности темы. В настоящее время в медицинской практике разрешены к применению корневища с корнями, цветки первоцвета весеннего, на основе которых созданы зарубежные отхаркивающие ЛРП, включены в Государственный реестр лекарственных средств для медицинского применения РФ (ГРЛС), международные фармакопеи. В числе зарегистрированных – «Бронхикум», «Бронхикум эликсир» (Rhône-Poulenc Rorer), «Бронхипрет® ТП» (BionoricaAG), «Гербион сироп первоцвета» (KRKA). Листья данного растения разрешены к применению в качестве поливитаминного пищевого растительного сырья (ГОСТ 3166-76 «Листья первоцвета весеннего»). В отечественной и зарубежной литературе имеются сведения об изучении химического состава первоцвета весеннего: сапонинов (Мичник О.В., 1976; Poracova J., 2009; Mulas S., 2012; Борисова Д.А., 2013; Латыпова Г.М., 2015; ApreL., 2017), в соответствии с Европейской Фармакопеей стандартизацию корневищ с корнями *Primulaveris* L. проводят по содержанию эсцина (EuropeanPharmacopoeia, 2008); фенольных соединений (RichardsJ., 1993; Романова З.Р., 2010; Борисова Д.А., 2013; Латыпова Г.М., 2015); полиметоксилированных флавоноидов (BudzianowskiJ., 2005; VitaliniS., 2011; Латыпова Г.М., 2015); липофильных соединений (SayanovaO., 1999; Латыпова Г.М., 2015).

Несмотря на достаточную изученность химического состава и фармакологических свойств первоцвета весеннего, вопросы целенаправленного фитохимического исследования сырья разной степени измельчения и переработки, экстрактов, изучения влияния факторов на выход БАС, получения рациональной лекарственной формы, разработки методов оценки качества решены не в полной мере. Это и обусловило выбор темы диссертационного исследования.

Цель работы и основные задачи исследования. Целью настоящей работы является фармакогностическое исследование первоцвета весеннего, направленное на разработку и совершенствование методов стандартизации сырья и лекарственных средств на его основе.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Провести фитохимическое исследование сырья первоцвета весеннего для получения лекарственных растительных средств.
2. Провести анатомо-морфологическое исследование и установить диагностические признаки измельченного сырья травы первоцвета весеннего для стандартизации лекарственной формы – фильтр-пакет.

3. Провести исследования по подбору оптимальных условий извлечения биологически активных соединений травы первоцвета весеннего и разработке способов получения экстрактов.

4. Провести сравнительное фитохимическое исследование сырья и экстрактов на основе травы первоцвета весеннего.

5. Обосновать состав и технологию получения фармацевтической субстанции растительного происхождения (ФСРП) «Густой экстракт из травы первоцвета весеннего», лекарственного растительного препарата «Первоцвета весеннего сироп».

6. Провести исследования по стандартизации и разработке методик качественного и количественного анализа лекарственных средств (ЛС) «Густой экстракт из травы первоцвета весеннего», «Первоцвета весеннего сироп».

7. На основе результатов фармакогностических исследований разработать нормативную документацию (НД) на ЛС «Первоцвета весеннего трава», «Густой экстракт из травы первоцвета весеннего», «Первоцвета весеннего сироп».

Научная новизна. Проведено фитохимическое изучение сырья первоцвета весеннего для получения лекарственных растительных средств. Методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) изучен состав водорастворимых витаминов травы первоцвета весеннего, среди которых фолиевая кислота, пиридоксина гидрохлорид и тиамин гидрохлорид обнаружены впервые. Исследован состав полифенольных соединений с использованием методов хроматографии [тонкослойной (ТСХ), хроматоденситометрии, ВЭЖХ, хромато-масс-спектрометрии (ГХ/МС)], идентифицировано 28 соединений фенольной природы, из которых 18 отнесены к флавоноидам (в том числе 9 – к полиметоксилированным), 2 – к кумаринам, 1 – к простым фенолам, 1 – к дубильным веществам, 1 – к антраценпроизводным, 5 – к оксикоричным кислотам, 1 – к фенолокислотам. В траве первоцвета весеннего из группы полиметоксилированных флавоноидов впервые выделен и идентифицирован 5-гидрокси-4-метокси-7-метил-флаван, из группы антраценпроизводных гликозидов – 1,8-диметокси-9,10-антрацендион. Методом хромато-масс-спектрометрии определен состав липофильных соединений, идентифицировано 11 веществ, среди которых витамин Е, сквален, этиловые эфиры 9-гексадеценовой, гексадекановой, 9,12-октадекадиеновой, 9,12,15-октадекатриеновой кислот, метиловый эфир 9,12,15-октадекатриеновой кислоты определены впервые.

Впервые исследовано анатомо-морфологическое строение измельченного сырья травы первоцвета весеннего. К диагностическим признакам отнесены простые двух-, трехклеточные волоски, расширенные у основания и заостренные на конце, а также железистые волоски с одноклеточными головками шаровидной формы, заполненные серо-бурой массой.

Впервые проведено сравнительное фитохимическое изучение сырья и экстрактов на основе травы первоцвета весеннего по доминирующим группам БАС. Разработан оптимальный способ получения субстанции и подтверждена идентичность качественного состава сырья и экстракта. Разработаны методические

и методологические подходы к стандартизации сырья и ФСРП «Густой экстракт из травы первоцвета весеннего» с использованием ТСХ, спектрофотометрии.

Обоснована перспективность использования ФСРП «Густой экстракт из травы первоцвета весеннего» в качестве гепатозащитного, противовоспалительного, эндотелиопротекторного и отхаркивающего средства.

Обоснованы состав, способ получения, методы контроля качества ЛС на основе травы первоцвета весеннего «Первоцвета весеннего сироп» с использованием принципов унификации, применяемых в современной стандартизации.

Новизна исследований подтверждена патентами РФ на изобретения: «Новое природное вещество из травы первоцвета весеннего» (патент № 2532999 от 20.01.15); «Средство растительного происхождения, обладающее гепатозащитным действием» (патент № 2554493 от 27.06.15); «Средство растительного происхождения, обладающее эндотелиопротекторной активностью» (патент № 2561064 от 20.08.15).

Теоретическая и практическая значимость. На основе анатомо-морфологических исследований определены характеристики показателей качества измельченного сырья травы первоцвета весеннего, разработан проект НД «Первоцвета весеннего трава» (ООО «Травы Башкирии», г. Уфа).

Разработаны состав, способ получения, определены показатели качества и методы их оценки для ФСРП на основе травы первоцвета весеннего «Густой экстракт из травы первоцвета весеннего», ЛРП «Первоцвета весеннего сироп».

Предложены методики качественного и количественного анализа основных действующих веществ в лекарственном растительном сырье (ЛРС), ФСРП и ЛРП, отвечающие принципам унификации, предъявляемым к современному фармацевтическому анализу (Самылина И.А. и др., 1994; 2006). Разработанные методики внедрены в работу кафедр фармации ИДПО, фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии Башкирского государственного медицинского университета, фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии Самарского государственного медицинского университета.

На основании проведенных исследований разработаны проекты НД «Густой экстракт из травы первоцвета весеннего», «Первоцвета весеннего сироп» (согласован с ООО «Травы Башкирии»).

Методология и методы исследования. Методология диссертационного исследования основана на информационно-аналитическом поиске отечественных и зарубежных литературных данных по фармакогностическому, фитотехнологическому, фармакологическому исследованию первоцвета весеннего, оценке изученности и актуальности темы; фитохимическом, анатомо-морфологическом, стандартизационном, фармакологическом исследовании лекарственного растительного сырья и ЛС на его основе.

В ходе выполнения диссертационной работы использованы физические, физико-химические, химические, макро- и микроскопические, фармакологические и статистические методы анализа.

Связь задач исследования с планами научных работ. Диссертация выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России) по проблеме «Изыскание и изучение новых лекарственных средств» (государственная регистрация № 01200707996).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Результаты фитохимического исследования сырья первоцвета весеннего для получения лекарственных растительных средств.
2. Результаты анатомо-морфологического исследования измельченного сырья травы первоцвета весеннего для стандартизации лекарственной формы – фильтр-пакет.
3. Результаты исследований по подбору оптимальных условий извлечения БАС и разработке способов получения экстрактов на основе травы первоцвета весеннего.
4. Результаты сравнительного фитохимического исследования сырья и экстрактов на основе травы первоцвета весеннего.
5. Результаты обоснования состава и технологии получения фармацевтической субстанции растительного происхождения «Густой экстракт из травы первоцвета весеннего», лекарственного растительного препарата «Первоцвета весеннего сироп».
6. Результаты исследований по стандартизации и разработке методик качественного и количественного анализа ЛС «Густой экстракт из травы первоцвета весеннего», «Первоцвета весеннего сироп».
7. Результаты фармакологических исследований лекарственных растительных средств на основе травы первоцвета весеннего.

Степень достоверности. Достоверность полученных результатов подтверждена проведением достаточного количества экспериментальных исследований с применением современных методов исследований (колоночная, тонкослойная хроматография, УФ-, ЯМР¹H-, ЯМР¹³C-спектроскопия, корреляционная спектроскопия ЯМР ¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HSQCED, HMBC, хромато-масс-спектрометрия, микроскопия), позволяющих получать воспроизводимые и достоверные результаты.

Статистическая обработка результатов исследований проводилась согласно требованиям ГФ РФ XIII издания с использованием программного обеспечения «Statistica 8.0», «MicrosoftExcel 2016».

Апробация работы. Основные положения диссертационного исследования представлены на ежегодных итоговых научных сессиях Башкирского государственного медицинского университета (Уфа, 2012–2017); на II международном конгрессе «Физическое и духовное здоровье: традиции и инновации» (Москва, 2012); на международной конференции «Кластерные подходы фармацевтического союза: образование, наука и бизнес» (Белгород, 2012); на VIII, IX международных симпозиумах «Фенольные соединения: фундаментальные и

прикладные аспекты» (Москва, 2012; 2015); на Всероссийской молодежной конференции «Фармакологическая коррекция процессов жизнедеятельности. Доклинические и клинические исследования новых лекарственных препаратов» (Уфа, 2012); на международных конференциях «Экобиотех» (Уфа, 2011; 2013); на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Фармацевтическое образование, современные аспекты науки и практики» (Уфа, 2016); на VII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2017); XXIV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2017).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 16 научных работ, 10 из которых опубликованы в журналах, включенных в Перечень ВАК Министерства образования и науки РФ. Имеются 3 патента РФ на изобретение.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе кафедр фармации ИДПО, фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии Башкирского государственного медицинского университета, кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии Самарского государственного медицинского университета, ООО «Травы Башкирии», в Государственном бюджетном учреждении здравоохранения «Республиканский центр контроля качества и сертификации лекарственных средств» (ГБУЗ «Лекконтроль»).

Личный вклад автора. Автору принадлежит ведущая роль в выполнении экспериментальных исследований, интерпретации, анализе и обобщении полученных результатов. На всех этапах исследования: от информационно-аналитического поиска, постановки задач, их экспериментально-теоретической реализации до обсуждения результатов в докладах и научных публикациях – вклад автора является определяющим.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационное исследование соответствует паспорту научной специальности 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (пунктам 2, 3, 6).

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 175 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы (1 глава), экспериментальной части и обсуждения полученных результатов (главы 2, 3, 4, 5), общих выводов, списка литературы, приложений. В диссертации содержится 54 таблицы, 52 рисунка. Библиографический список состоит из 152 источников, из которых 111 отечественных и 41 иностранных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектами исследования служили образцы сырья – трава первоцвета весеннего (*PrimulaverisL.*), собранная на территории Республики Башкортостан в 2012 – 2016 годах. Для проведения исследований использовали водные и водно-спиртовые извлечения, густые экстракты, сироп на основе густого экстракта, индивидуальные соединения, выделенные из травы первоцвета весеннего.

Обнаружение биологически активных соединений в траве первоцвета весеннего проводили с помощью качественных реакций, методами тонкослойной, высокоэффективной жидкостной хроматографии на хроматографе «Gilston» (модель 305, Франция), газожидкостной хромато-масс спектрометрии на хроматографе «Agilent Technologies» (США), денситометрии на денситометре «Sorbfil» (Россия).

Исследование химического состава изучаемого сырья проводили методом адсорбционной жидкостной колоночной хроматографии с использованием различных сорбентов: силикагель L 40/100 мкм (Чехия), полиамид марки «Wolem» (Германия). Экстракцию осуществляли смесью хлороформ – этанол в различных соотношениях, спиртом этиловым 95 %.

Идентификацию выделенных веществ проводили на ЯМР спектрометре высокого разрешения «BrukerAvance III 500MHz» методами ЯМР¹H-, ЯМР¹³C – спектроскопии; корреляционной спектроскопии ЯМР ¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HSQCED, НМВС; хромато-масс-спектрометрии, а также с использованием данных УФ-спектроскопии, ТСХ, сравнением со стандартными образцами веществ (СО). Определение количественного содержания суммы флавоноидов в пересчёте на рутин, сапонинов в пересчете на эсцин проводили с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-1800. В качестве стандартных образцов использовали коммерчески доступные индивидуальные вещества фирмы «Sigma-aldrich», «Fluka», «JCN» (USA).

Анатомо-морфологическое исследование проводили с помощью микроскопов «Биолам», «Минимед-501», цифровой насадки, микровизора проходящего света серии «μ Vizo-100», а также с применением светового микроскопа «AxioImager 1» («CarlZeiss», Jena) с вмонтированной камерой «AxioCamMRc 5».

Получение водно-спиртовых экстрактов осуществляли методом модифицированной мацерации, сиропа – в соответствии с классическими правилами технологии приготовления сиропов.

Биологическому и фармакологическому скринингу подвергались водно-спиртовые извлечения, густые экстракты и сиропы травы первоцвета весеннего согласно «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Миронов А.Н., Бунятян Н.Д. и др., Москва, 2012).

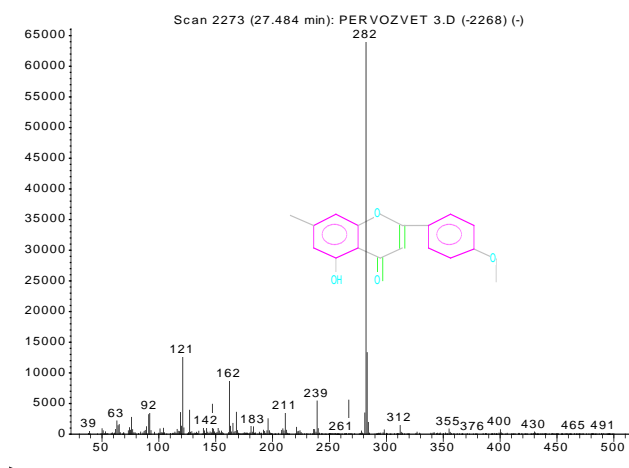


Рисунок 2. Масс-спектр 5-гидрокси-4-метокси-7-метил-флавонон

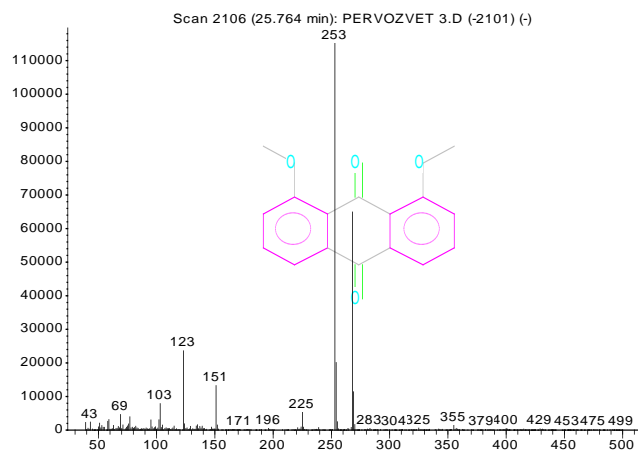


Рисунок 3. Масс-спектр 1,8-диметокси-9,10-антрацендион

Методами ГХ/МС установлено наличие 11 липофильных соединений, среди которых в исследуемом сырье впервые определены витамин Е, сквален, этиловые эфиры 9-гексадеценовой, гексадекановой, 9,12-октадекадиеновой, 9,12,15-октадекатриеновой кислот, метиловый эфир 9,12,15-октадекатриеновой кислоты (рисунки 4, 5).

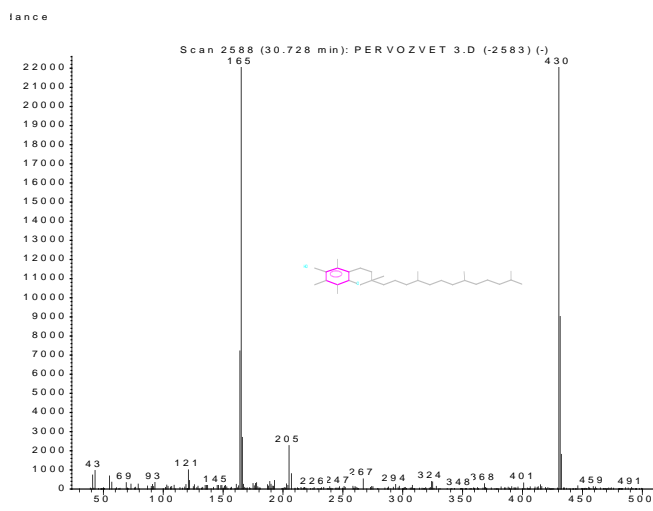


Рисунок 4. Масс-спектр витамина Е

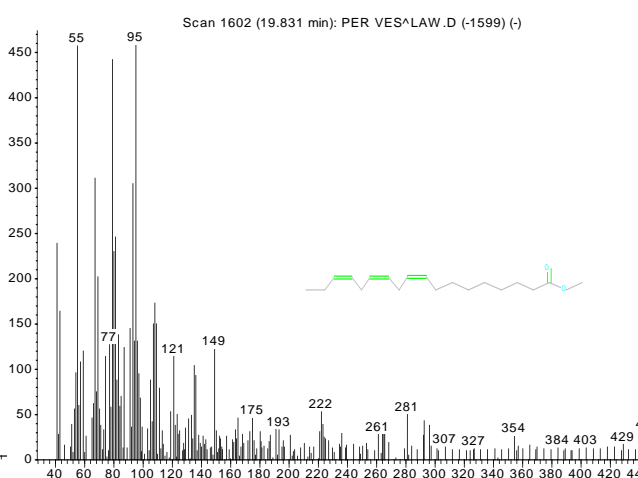


Рисунок 5. Масс-спектр метилового эфира 9,12,15-октадекатриеновой кислоты

Количественный анализ содержания основных групп БАС проводили методами спектрофотометрии и титриметрии. Исследования показали наличие в сырье: суммы окисляемых веществ – $13,65 \pm 0,38$, кислоты аскорбиновой – $3,58 \pm 0,08\%$, танина – $1,56 \pm 0,04\%$, кислоты галловой – $0,97 \pm 0,02\%$, суммы флавоноидов в пересчете на рутин – $4,88 \pm 0,09\%$, тритерпеновых сапонинов в пересчете на эсцин – $3,46 \pm 0,09\%$.

2. Исследование подлинности и показателей качества измельченного сырья первоцвета весеннего для разработки лекарственных средств

Исследование измельченного сырья

Для разработки дозированной лекарственной формы из ЛРС фильтр-пакет впервые проведено исследование измельченного сырья первоцвета весеннего.

Аналізу подвергали фракции измельченного сырья, предварительно просеянного через систему сит различного диаметра (3 мм, 2мм, 1мм). Выявлены и количественно охарактеризованы микродиагностические признаки, определяющие подлинность сырья. Измельченное сырье представляло собой смесь кусочков листьев, черешков, почти голых и слабо опушенных, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм. Цвет от серовато-зеленого до светло-зеленого. При рассмотрении измельченного сырья под лупой (10х) и стереомикроскопом (8х, 16х) видны: кусочки листовых пластинок серовато-зеленого цвета, голые или тонко слабо-войлочно опушенные снизу; кусочки черешков светло-зеленого цвета, снизу слабо железисто-опушенные. Запах слабый, слегка медовый. Вкус водного извлечения сначала сладкий, затем горьковатый.

К основным микродиагностическим признакам измельченного сырья можно отнести однослойный эпидермис, слегка извилистые клетки верхнего эпидермиса и сильноизвилистые клетки нижнего эпидермиса листовой пластинки с тонкими оболочками. Устьица округлой или овальной формы аномоцитного типа с замыкающими клетками почковидной формы. Характерными также являются признаки черешка листа: клетки эпидермиса прозенхимной формы с наклонными боковыми стенками, покрытые однослойным эпидермисом. Отмечены множественные волоски двух типов – простые и железистые (рисунокб). Для элементов цветоносной стрелки характерными являются клетки таблитчатой формы с наклонными боковыми стенками, единичными устьицами, волосками двух типов, отсутствие кутикулы. Клетки эпидермиса чашелистика имеют извилистую форму, кутикула отсутствует, отмечены волоски простого и железистого типа. Элементы венчика имеют однослойный эпидермис, клетки неопределённой формы, кутикула отсутствует, отмечены проводящие пучки, представленные сосудами.

К диагностически значимым признакам для эпидермиса листьев, черешка листа, цветоносной стрелки, чашелистика отнесены простые двух-, трехклеточные волоски, расширенные у основания и заостренные на конце, а также железистые волоски с одноклеточными головками шаровидной формы, заполненные серо-бурой массой.

Для стандартизации сырья первоцвета весеннего были разработаны методики количественного определения основных групп действующих веществ – флавоноидов и сапонинов, установлены нормы их содержания.

Оценку качественного состава рекомендовано проводить методом ТСХ в системе растворителей спирт бутиловый - кислота уксусная ледяная - дистиллированная вода (БУВ) (4:1:2); должно обнаруживаться две зоны адсорбции на уровне СО рутина и

гиперозида, а также в системе растворителей этилацетат – спирт метиловый – диэтиламин (70:20:15) с обнаружением зоны адсорбции на уровне СО эсцина.

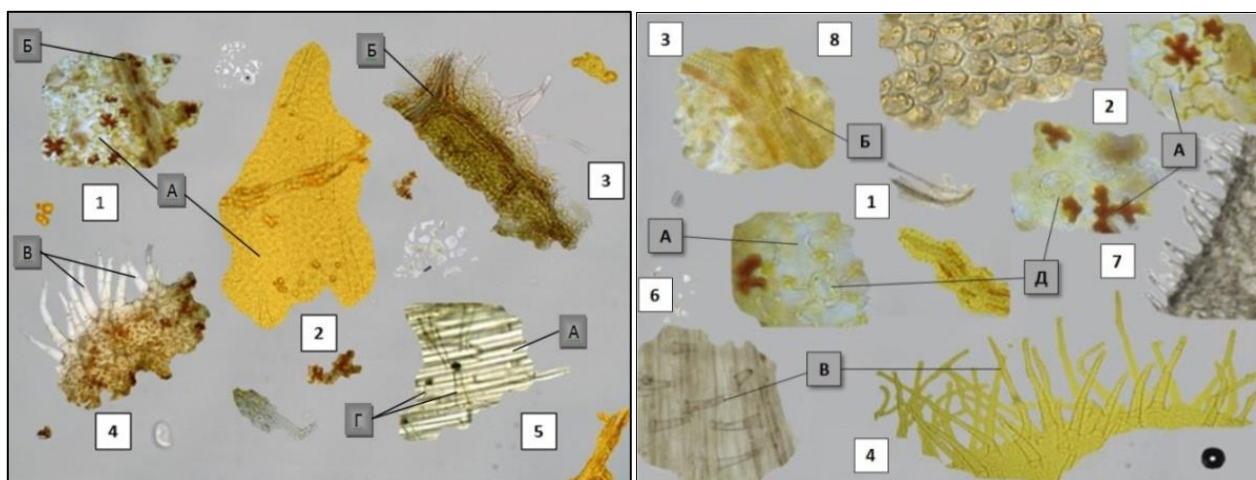


Рисунок 6. Фрагменты измельченного сырья первоцвета весеннего (увел. $\times 400$, $\times 100$)

Обозначения: 1 – верхний эпидермис листа; 2 – нижний эпидермис листа;

3 – эпидермис вдоль жилки листа; 4 – край листа; 5 – черешок;

6 – цветоносная стрелка; 7 – чашелистик; 8 – венчик. А – клетки эпидермиса;

Б – жилка; В – простые волоски; Г – железистые волоски, Д – устьица

Для оценки количественного содержания флавоноидов в сырье был использован метод дифференциальной спектрофотометрии с применением реакции комплексообразования с алюминия хлоридом в среде спирта этилового 70%. В качестве СО выбран рутин, максимум поглощения 410 нм. На основании полученных данных установлены нормы содержания флавоноидов в пересчете на рутин: не менее 2,0%. Для оценки содержания сапонинов использован метод спектрофотометрии. В качестве СО выбран эсцин, максимум поглощения 325 нм. Определены параметры экстракции. На основании полученных данных установлены нормы содержания сапонинов в пересчете на эсцин: не менее 2,5%. Определены числовые показатели измельченного сырья первоцвета весеннего.

Исследование водных извлечений

В связи с тем, что традиционной лекарственной формой из ЛРС являются водные вытяжки, представляло интерес исследование водных извлечений из сырья первоцвета весеннего.

Изучено влияние факторов на выход БАС из сырья; методом трехфакторного математического планирования эксперимента определены оптимальные условия технологии изготовления водного извлечения. В качестве значимых факторов были выбраны и изучены следующие: время экстракции, соотношение сырье – экстрагент, степень измельчения сырья. Оценку эксперимента проводили по количественному содержанию доминирующей группы БАС – флавоноидам (в пересчете на рутин). Исследования показали, что оптимальными параметрами оказались: время экстракции

– 60 минут, соотношение сырья и экстрагента – 1:10, степень измельчения сырья – 1 – 3 мм.

3. Фитохимическое изучение водно-спиртовых извлечений, разработка и стандартизация фармацевтической субстанции из сырья первоцвета весеннего

Фитохимическое исследование водно-спиртовых извлечений

Результаты исследований по химическому составу сырья первоцвета весеннего показали наличие гидрофильных и липофильных групп БАС. Экспериментально доказано, что оптимальным экстрагентом, обеспечивающим максимальный выход основных групп БАС является раствор 70% спирта этилового. Для определения оптимального способа получения водно-спиртового извлечения из травы первоцвета весеннего использовался двухфакторный метод математического планирования эксперимента. В качестве значимых факторов были выбраны и изучены способ экстракции, метод очистки. Экстрагирование проводили методом дробной мацерации, экстрагент – спирт этиловый разной концентрации, способ очистки – отстаивание. Нами получены экстракты тремя способами: 1 способ – изменение концентрации спирта этилового 70% и 96% (извлечение 1); 2 способ – экстрагирование 70% спиртом этиловым с использованием нагревания на конечном этапе (извлечение 2); 3 способ – трехкратная экстракция 70% спиртом этиловым (извлечение 3).

Для выбора оптимального способа получения провели сравнительное фитохимическое изучение полученных экстрактов методами ВЭЖХ и ГХ/МС. Так как доминирующей группой БАС являются полифенольные соединения, представляло интерес провести сравнительный анализ их состава (таблицы 1, 2, рисунки 7, 8, 9).

Таблица 1 – Сравнительное изучение состава фенольных соединений извлечений из травы первоцвета весеннего

Компоненты	Rt, мин			
	Сырье	Извлечение 1	Извлечение 2	Извлечение 3
Арбутин	5,73	-	-	-
Галловая кислота	6,24	6,23	6,23	6,24
Хлорогеновая кислота	7,36	7,35	7,35	7,34
Кофейная кислота	8,76	8,76	8,76	8,75
Цикориевая кислота	10,40	10,40	10,39	10,40
Рутин	24,85	24,85	24,85	24,85
Гиперозид	26,15	26,15	26,15	26,15
Витексин	31,11	31,10	31,10	31,09
Байкалин	41,51	41,51	41,50	41,50
Кверцетин	53,27	53,27	53,27	53,27
Апигенин	69,75	69,74	69,73	69,74

Таблица 2 – Сравнительное изучение состава полиметоксилированных флавоноидов извлечений из травы первоцвета весеннего

Компоненты	Rt, мин			
	Сырье	Извлечение 1	Извлечение 2	Извлечение 3
Кумарин	12,20	12,19	12,19	12,20
Флаван (хромакор)	23,35	23,34	23,34	23,37
8-метокси-флаван	25,06	25,04	25,03	25,08
3'-метокси-флаван	25,51	25,50	25,49	25,53
3,4-метилендиокси-5-метоксифлаван	24,59	24,60	24,60	24,60
1,8-диметокси-9,10-антрацендион	25,75	25,74	25,74	25,76
5-гидрокси-4-метокси-7-метил-флаван	27,47	27,46	27,46	27,49
3-ацетил-7,8-ди-метокси-2-метил-1Н-бензо[f]хромен-1-он	28,41	28,39	28,39	28,43
5, 6, 2', 6'-тетраметокси-флаван (запотин)	28,80	28,78	28,77	28,83
5,6,7,3',4' – пентаметокси-флаван (синенсетинт)	29,90	29,89	28,89	28,92

Проведенный анализ качественного состава полифенольных соединений показал практическую идентичность полученных извлечений.

Не менее важной группой с точки зрения фармакологических свойств являются липофильные соединения. В связи с этим проведен сравнительный анализ их состава (таблица 3, рисунки 7, 8, 9).

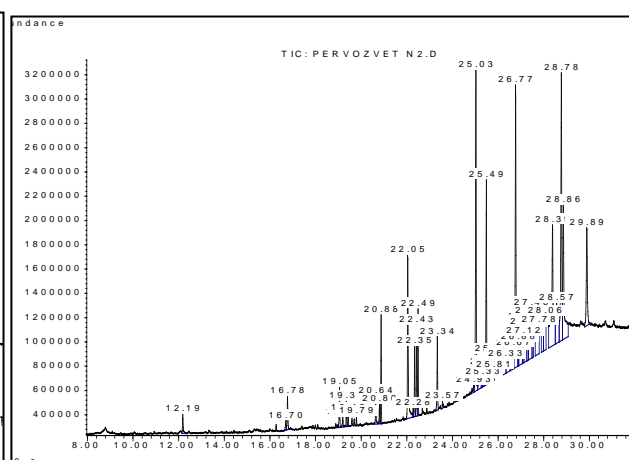
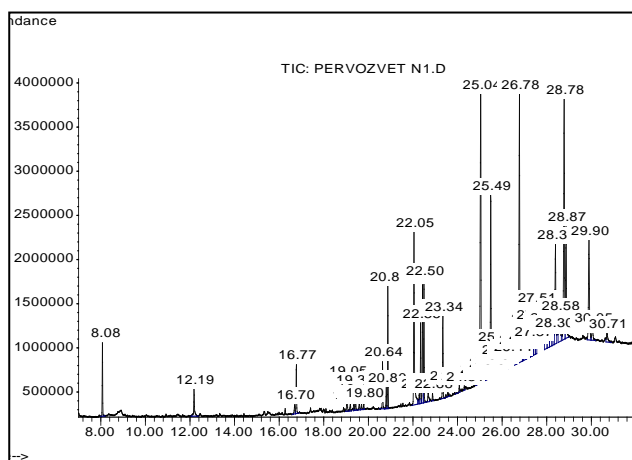


Рисунок 7. Хроматограмма извлечения 1

Рисунок 8. Хроматограмма извлечения 2

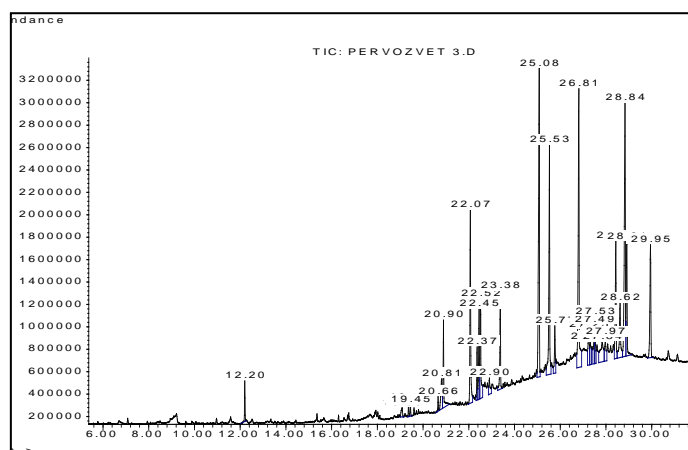


Рисунок 9. Хроматограмма извлечения 3

Таблица 3 – Сравнительный анализ состава липофильных соединений извлечений из травы первоцвета весеннего

Компоненты	Rt, мин			
	Сырье	Извлечение 1	Извлечение 2	Извлечение 3
6,10,14-триметил-2-пентадеканон	19,44	19,43	19,43	19,45
Этиловый эфир 9-гексадеценной кислоты	20,81	20,8	20,8	20,81
Этиловый эфир гексадекановой кислоты	20,88	20,88	20,87	20,89
Фитол	22,06	22,05	22,05	22,07
Этиловый эфир 9,12-октадекадиеновой кислоты	22,44	22,43	22,43	22,45
Этиловый эфир 9,12,15-октадекатриеновой кислоты	22,51	22,5	22,49	22,52
Сквален	27,52	-	27,5	27,53
Витамин-Е	30,73	30,71	30,72	30,74
Этиловый эфир тетрадекановой кислоты	18,89	-	18,89	18,89
Метилловый эфир 9,12,15-октадекатриеновой кислоты	22,36	22,34	22,34	22,37
Этиловый эфир октадекановой кислоты	22,69	22,67	22,68	22,7

Проведенный анализ качественного состава липофильных соединений также показал незначительные отличия полученных извлечений.

Нами также было проведено сравнительное изучение количественного состава основных групп БАС полученных извлечений, результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Сравнительный анализ количественного состава основных групп БАС извлечений из травы первоцвета весеннего

Биологически активные соединения	Извлечения		
	1	2	3
Органические кислоты, %	15,54	15,78	15,63
Дубильные вещества (в пересчете на танин), %	2,89	1,99	2,76
Дубильные вещества (в пересчете на галловую кислоту), %	7,76	5,86	6,90
Флавоноиды (в пересчете на рутин), %	5,81	3,80	5,44
Сапонины (в пересчете на эсцин), %	12,92	11,86	12,21

В ходе проведенных исследований установлено, что наиболее оптимальными извлечениями по качественному составу, количественному содержанию основных групп БАС являются извлечения 1 и 3.

Так как полифенольные и липофильные соединения обуславливают антиоксидантные свойства лекарственных растений, представляло интерес провести сравнительный анализ антиоксидантной активности исследуемых извлечений. Исследования проводили методом хемилюминесценции (ХЛ) на модели железоиндуцированной ХЛ в двух модельных системах (МС): генерирующая активные формы кислорода (АФК) и моделирующая перекисное окисление липидов (ПОЛ). Данные о влиянии извлечений на ХЛ в указанных МС представлены в таблице 5 и на рисунке 10.

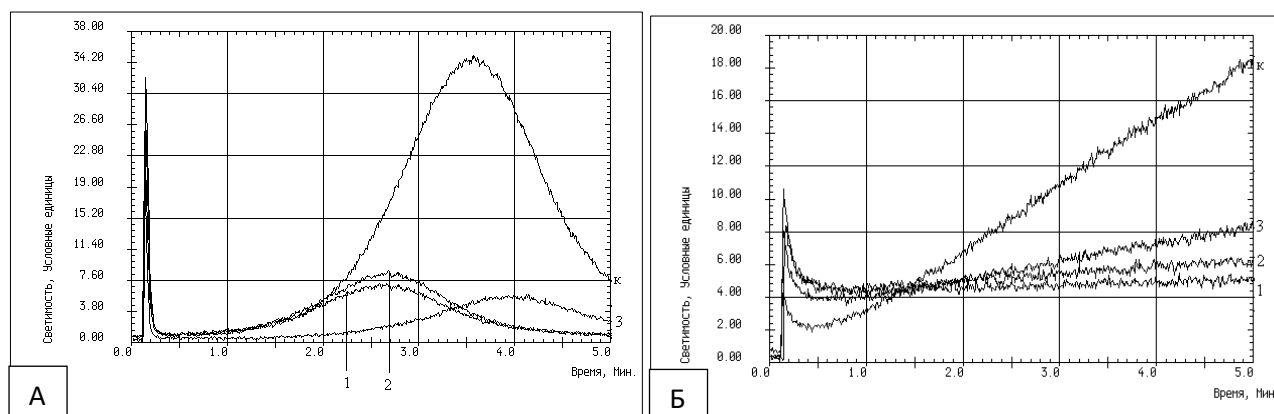


Рисунок 10. Влияние извлечений на процессы СРО в модельных системах.

А – МС АФК, Б – МС ПОЛ, К – контроль, 1 –извлечение 3(0,1 мл);

2 –извлечение 2(0,1 мл); 3 –извлечение 1(0,1 мл).

Таблица 5 – Влияние извлечений на показатели хемилюминисценции

Опыт	Добавляемый объём, мл	ХЛ в МС АФК, %.	ХЛ в МС ПОЛ, %.
Контроль		100	100
Извлечение 1	0,01	45,06*	62,32*
	0,1	18,03*	30,08*
Извлечение 2	0,01	44,97*	56,64*
	0,1	25,73*	29,64*
Извлечение 3	0,01	38,12*	57,41*
	0,1	23,77*	27,67*

* – отмечены достоверные отличия ($p < 0,05$)

Исследования показали, что в обеих модельных системах изучаемые извлечения травы первоцвета весеннего действовали в одинаковом направлении: снижали процессы образования свободных радикалов, проявляли прямое антиоксидантное действие (патент РФ № 2342942 от 10.01.2009 г.).

Также установлено, что по качественному составу, количественному содержанию основных групп БАС и биологическим свойствам преимущества имеют извлечения 1 и 3, но по органолептическим, физико-химическим и технологическим свойствам, в том числе по растворимости, приоритетным явилось извлечение 3, которое и было выбрано для дальнейшего исследования.

Таким образом, оптимальными параметрами экстракции явились следующие: способ экстракции – дробная мацерация с использованием в качестве экстрагента 70% раствора спирта этилового; метод очистки – отстаивание.

Разработка и стандартизация фармацевтической субстанции из травы первоцвета весеннего

Густой экстракт из травы первоцвета весеннего получали путем сгущения водно-спиртового извлечения (извлечение 3). Технология изготовления густого экстракта включала в себя следующие стадии: подготовка растительного сырья, подготовка экстрагента, получение первичной вытяжки; очистка вытяжки от балластных веществ, выпаривание. Разработана технологическая схема получения ФСРП «Густой экстракт из травы первоцвета весеннего».

С учетом преимущества подходов к стандартизации в ряду «сырье – субстанция – лекарственный препарат» для стандартизации полученной субстанции использованы разработанные методики качественного и количественного анализа для сырья первоцвета весеннего, адаптированы для субстанции «Густой экстракт из травы первоцвета весеннего», установлены нормы их содержания.

Анализ качественного состава как и в случае ЛРС рекомендовано проводить методом ТСХ в системе растворителей спирт бутиловый - кислота уксусная ледяная - дистиллированная вода (БУВ) 4:1:2, должно обнаруживаться две зоны адсорбции на

уровне СО рутина и гиперозида; а также в системе растворителей этилацетат – спирт метиловый – диэтиламин (70:20:15) с обнаружение зоны адсорбции на уровне СО эсцина.

Для оценки количественного содержания флавоноидов был использован метод дифференциальной спектрофотометрии с применением реакции комплексообразования с алюминия хлоридом в среде спирта этилового 70%. В качестве СО выбран рутин, максимум поглощения 410 нм. На основании полученных данных установлены нормы содержания флавоноидов в пересчете на рутин: не менее 5,5%.

Для оценки содержания сапонинов использован метод спектрофотометрии. В качестве СО выбран эсцин, максимум поглощения 325 нм. Определены параметры экстракции. На основании полученных данных установлены нормы содержания сапонинов в пересчете на эсцин: не менее 10%.

Определены показатели качества фармацевтической субстанции: физико-химические свойства (описание, растворимость, подлинность, цветность раствора), микробиологическая чистота, остаточные органические растворители, потеря в массе при высушивании, тяжелые металлы, что нашло отражение в НД.

4. Экспериментальные исследования по изучению фармакологической активности фармацевтической субстанции из травы первоцвета весеннего

Исследование острой токсичности позволили отнести ГЭТПВ к IV классу малоопасных веществ (ГОСТ 12.1.007.76). ЛД₅₀ экстракт а не была определена из-за его низкой токсичности.

Присутствие в ГЭТПВ флавоноидов, тритерпеновых сапонинов, насыщенных и ненасыщенных жирных кислот, витамина Е позволило предположить наличие гепатозащитной активности, что было установлено на модели острого СС₁₄ – гепатита и подтверждено патентом РФ № 2554493 от 27.06.2015 г..

Проведено экспериментальное изучение влияния ГЭТПВ на развитие острого воспаления у экспериментальных животных. Выявлена противовоспалительная активность, незначительно уступающая препарату сравнения диклофенаку, но достоверно превосходящая показатели контрольной группы.

Отхаркивающее действие ГЭТПВ определено на модели изучения моторной функции мерцательного эпителия пищевода лягушки по методике В.В. Гацура.

5. Разработка лекарственного препарата на основе густого экстракта из травы первоцвета весеннего

Для расширения ассортимента ЛС на основе первоцвета весеннего нами разработаны состав и технология получения ЛРП «Первоцвета весеннего сироп».

Образцы сиропов были получены на основе ГЭТПВ. В качестве вкусовых корригентов были изучены простой сахарный сироп, растворы фруктозы, сорбита и их сочетания. Приготовление сиропов проводили с учетом физико-химических

свойств компонентов. Сироп готовили в асептических условиях. Для оценки вкусовых характеристик сиропов использовали методику А.И. Андреевой. Установлено, что применение в качестве основы сахарозы позволило значительно улучшить вкус сиропа, получившего более высокую оценку в дегустационных группах. Поэтому дальнейшее изучение проводили с сиропом на сахарозе. В качестве консерванта нами был выбран натрия бензоат 0,5 %.

При разработке технологии приготовления сиропа изучали влияние температуры на сохранение БАС. В полученных сиропах определяли качественный состав, количественное содержание основных групп БАС, антиоксидантную активность. В ходе проведенных исследований установлено, что при термическом воздействии концентрация рутина и антиоксидантная активность сиропа снижаются, а концентрация эсцина не изменяется. Таким образом, обоснован состав и технология получения ЛРП «Первоцвета весеннего сироп».

Для стандартизации сиропа первоцвета весеннего были адаптированы разработанные методики качественного анализа и количественного определения основных групп БАС для сырья первоцвета весеннего, в результате установлены нормы их содержания в сиропе: суммарное содержание флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 0,15%; сапонинов в пересчете на эсцин – не менее 0,30%.

Эти и другие показатели качества ЛРП «Первоцвета весеннего сироп» (описание, подлинность, показатель преломления, значение pH, плотность, микробиологическая чистота) вошли в проект ФСП «Первоцвета весеннего сироп».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных диссертационных исследований научно обоснована целесообразность использования в медицинской практике лекарственных импортозамещающих средств на основе первоцвета весеннего в качестве антиоксидантных, гепатозащитных, эндотелиопротекторных, противовоспалительных, отхаркивающих средств.

Выводы

1. Фитохимическое исследование сырья первоцвета весеннего позволило установить наличие витаминов, свободных органических кислот, дубильных веществ, флавоноидов, сапонинов, антраценпроизводных и липофильных соединений. Методами хроматографии (ТСХ, хроматоденситометрии, ГХ/МС) идентифицировано 28 соединений фенольной природы, из которых 18 отнесены к флавоноидам (в том числе 9 к полиметоксилированным), 2 – к кумаринам, 1 – к простым фенолам, 1 – к фенолокислотам, 5 – к оксикоричным кислотам, 1 – к дубильным веществам, 1 – к антраценпроизводным.

2. Проведено анатомо-морфологическое исследование измельченного сырья травы первоцвета весеннего, определены диагностически значимые признаки: для

листовой пластинки характерны однослойный эпидермис, слегка извилистые клетки верхнего и сильноизвилистые клетки нижнего эпидермиса с тонкими оболочками, устьица аномоцитного типа; для черешка листа – клетки эпидермиса прозенхимной формы; для элементов цветоносной стрелки – клетки таблитчатой формы, единичные устьица; для чашелистика характерны клетки извилистой формы, отсутствие кутикулы; клетки эпидермиса венчика неопределенной формы; для всех морфологических частей травы характерно наличие простых двух-, трехклеточных волосков, расширенных у основания и заостренных на конце, а также железистых волосков с одноклеточными головками шаровидной формы, заполненных серо-бурой массой.

3. Разработаны подходы к стандартизации сырья первоцвета весеннего: для качественного анализа – тонкослойная хроматография извлечения на 70% спирте этиловом с использованием рутина и эсцина в качестве стандартных образцов; для количественного анализа – дифференциальная спектрофотометрия того же извлечения с использованием стандартного образца рутина, метод спектрофотометрии с использованием стандартного образца эсцина. Определены нормы содержания флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 3,0%, сапонинов в пересчете на эсцин – не менее 3,0%.

4. Проведены сравнительные фитохимические исследования водно-спиртовых извлечений, полученных различными способами, по качественному составу, количественному содержанию основных групп БАС, по антиоксидантной активности, органолептическим и физико-химическим свойствам. Предложен оптимальный способ получения экстракта – трехкратная экстракция 70% спиртом этиловым методом мацерации. Разработана технологическая схема получения «Густого экстракта из травы первоцвета весеннего».

5. Определены показатели качества, разработаны и апробированы методики качественного и количественного анализа «Густого экстракта из травы первоцвета весеннего»; установлены нормы содержания флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 5,5%, сапонинов в пересчете на эсцин – не менее 10,0%.

6. По результатам изучения острой токсичности густого экстракта из исследуемого сырья подтверждено, что он относится к IV классу малоопасных веществ; установлены антиоксидантные, гепатозащитные, противовоспалительные, эндотелиопротекторные, отхаркивающие свойства исследуемой субстанции и показана целесообразность создания лекарственных средств на основе травы первоцвета весеннего.

7. Обоснован состав и технология получения лекарственного растительного препарата на основе травы *P. veris* L. «Первоцвета весеннего сироп»; определены физико-химические свойства, микробиологическая чистота, показатели качества, установлено содержание флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 0,15%; сапонинов в пересчет на эсцин – 0,30%.

8. На основании результатов фармакогностических исследований разработаны проекты нормативной документации: «Первоцвета весеннего трава», «Густой экстракт из травы первоцвета весеннего», «Первоцвета весеннего сироп».

Практические рекомендации

Результаты диссертационной работы расширяют спектр представлений о представителях рода первоцвет и, в частности, позволяют рационально использовать в научной фармации и медицине первоцвет весенний. Разработанные в ходе диссертационных исследований подходы к стандартизации сырья могут быть использованы в учебном процессе по курсам «Фармакогнозия», «Фармацевтическая технология», «Фармацевтическая химия», а также в центрах сертификации и контроля качества лекарственных средств и на фармацевтических предприятиях.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Результаты диссертационного исследования имеют научно-практическое значение для фармакогнозии и фармацевтической химии, полученные данные могут служить основой для изучения химического состава и фармакологических свойств растений, содержащих флавоноиды и сапонины, а также для решения проблемы стандартизации ЛРС, в соответствии с современными требованиями к фармацевтическому анализу. Кроме того, важным является научное обоснование введения в отечественную номенклатуру травы первоцвета весеннего и расширения области применения изучаемого сырья в медицинской практике.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Латыпова, Г.М. Стандартизация листьев первоцвета весеннего по показателю «содержание аскорбиновой кислоты» / Г.М. Латыпова, В.Н. Бубенчикова, З.Р. Романова, Д.Ф. Галимова // **Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия Медицина. Фармация.** – 2012. – № 10 (129), вып. 18/2. – С. 51-56.
2. Латыпова, Г.М. Содержание флавоноидов в сырье первоцвета весеннего / Г.М. Латыпова, З.Р. Романова, В.Н. Бубенчикова, Д.Ф. Галимова // **Фармация.** – 2012. – № 6. – С. 20–22.
3. Латыпова, Г.М. Оптимизация условий водного извлечения из травы первоцвета весеннего (лекарственного) / Г.М. Латыпова, В.Н. Бубенчикова, Д.Ф. Галимова [и др.] // **Традиционная медицина.** – 2012. – № 5. – С. 271-274.
4. Латыпова, Г.М. Оптимизация получения современной лекарственной формы первоцвета весеннего на основании фитохимических и технологических исследований / Г.М. Латыпова, Р.Я. Давлетшина, Д.Ф. Иванова // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук.** – 2012. – Т. 15, № 3 (5). – С. 1653-1656.

5. Галимова, Д.Ф. Возможность использования растений рода «первоцвет» в медицинской практике / Д.Ф. Галимова, Г.М. Латыпова // **Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии.** – 2013. – № 5. – С. 33.
6. Латыпова, Г.М. Установление товароведческих показателей сырья первоцвета весеннего для изготовления фильтр-пакетов / Г.М. Латыпова, В.Н. Бубенчикова, Д.Ф. Галимова [и др.] // **Вопросы обеспечения качества лекарственных средств.** –2013. – № 1. – С.61-65.
7. Иванова, Д.Ф. Изучение ангиопротекторной активности растительного экстракта / Д.Ф. Иванова, Г.М. Латыпова, Г.Р. Иксанова, М.А. Быченкова// **Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.** – 2013. - № S. – С. 190-191.
8. Латыпова, Г.М. К изучению новых фармакологических свойств растительного экстракта и травы первоцвета весеннего / Г.М. Латыпова, Г.Р. Иксанова, М.А. Быченкова, Д.Ф. Иванова // **Традиционная медицина.** – 2014. – № 4 (39). – С. 14-16.
9. Латыпова, Г.М. Состав органических кислот в растениях рода первоцвет/ Г.М. Латыпова, Д.Ф. Иванова, Р.Я. Давлетшина, О.И. Уразлина// **Сибирский медицинский журнал.** – 2014. – № 3. – С.96-98.
10. Иванова, Д.Ф. Исследование антиоксидантной активности экстрактов из травы первоцвета весеннего / Д.Ф. Иванова, М.А. Быченкова, И.В. Петорова, В.В. Катаев // **Фармация.** – 2017. – Спец.вып. VII Всероссийская научная конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», 24-25 апреля 2017 г., Санкт-Петербург. – С.668-671.
11. Галимова, Д.Ф. Разработка технологии водного извлечения из травы первоцвета весеннего / Д.Ф. Галимова, Г.М. Латыпова, Р.Я. Давлетшина // Кластерные подходы фармацевтического союза: образование, наука и бизнес: сборник материалов II Международной научно-практической конференции (26 апреля 2012 г., Белгород) / под ред. проф. И.В. Спичак. – Белгород: ИПК НИУ «БелГУ», 2012. – С. 132-134.
12. Галимова, Д.Ф. Перспективы использования первоцвета весеннего как импортозамещающего лекарственного растительного сырья / Д.Ф. Галимова, Г.М. Латыпова, Р.Я. Давлетшина, В.А. Катаев // Фармакологическая коррекция процессов жизнедеятельности. Доклинические и клинические исследования новых лекарственных препаратов: материалы Всероссийской молодежной конференции. – Уфа, 2012. – С. 35-38.
13. Галимова, Д.Ф. Некоторые вопросы стандартизации сырья первоцвета весеннего для производства фильтр-пакета / Д.Ф. Галимова // **Вестник Башкирского государственного медицинского университета.** - 2013. - № 1 (приложение). - С. 1644-1647.
14. Латыпова, Г.М. Изучение влияния технологических факторов на выход биологически активных веществ из сырья первоцвета весеннего / Г.М. Латыпова, Д.Ф. Иванова, В.А. Катаев, Ф.Х. Кильдияров // **Медицинский вестник Башкортостана.** – 2016. - Т. 11, № 5 (65). – С.87-90.

15. Иванова, Д.Ф. К вопросу по изучению влияния фильтр-пакетов на выход биологически активных веществ травы первоцвета весеннего / Д.Ф. Иванова, Г.М. Латыпова, В.А. Катаев, Ф.Х. Кильдияров // Фармацевтическое образование, современные аспекты науки и практики: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием / под ред. В.А. Катаева. – Уфа, 2016. – С. 97-99.

16. Иванова, Д.Ф. Оптимизация технологии получения водно-спиртового извлечения из травы первоцвета весеннего / Д.Ф. Иванова, Г.М. Латыпова, Ф.Х. Кильдияров [и др.] // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2017. - №1. - С. 51-55.

Патенты

1. Новое природное вещество из травы первоцвета весеннего: пат. № 2532999 Рос. Федерация / Латыпова Г.М., Бубенчикова В.Н., Куркин В.А., Катаев В.А., Иванова Д.Ф., Салихов Ш.М.; заявитель и патентообладатель Башк. гос. мед. ун-т. – № 2013144706/04; заявл. 04.10.2013; опубл. 20.01.15, Бюл. № 2.

2. Средство растительного происхождения, обладающее гепатозащитным действием: пат. № 2554493 Рос. Федерация / Латыпова Г.М., Иксанова Г.Р., Быченкова М.А., Катаев В.А., Иванова Д.Ф., Бубенчикова В.Н., Волевач Л.В.; заявитель и патентообладатель Башк. гос. мед. ун-т. – № 2014114957/15; заявл. 15.04.2014; опубл. 27.06.15, Бюл. № 18.

3. Средство растительного происхождения, обладающее эндотелиопротекторной активностью: пат. № 2561064 Рос. Федерация / Иксанова Г.Р., Латыпова Г.М., Соколов Г.В., Галимов Ш.Н., Катаев В.А., Бубенчикова В.Н., Исхаков И.Р., Иванова Д.Ф.; заявитель и патентообладатель Башк. гос. мед. ун-т. – № 2014114958/15; заявл. 15.04.2014; опубл. 20.08.15, Бюл. № 23.