

САЗАНОВА КСЕНИЯ НИКОЛАЕВНА

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

14.04.02 - Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России)

Научный руководитель:

кандидат химических наук, доцент *Шарипова Сафия Хакимовна*

Официальные оппоненты:

Латыпова Гузель Минулловна - доктор фармацевтических наук, доцент; федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра послевузовского и дополнительного профессионального фармацевтического образования Института дополнительного профессионального образования, профессор кафедры;

Курбатова Светлана Викторовна - доктор химических наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Самарский национальный исследовательский университет имени академика С.П. Королева», кафедра физической химии и хроматографии, профессор кафедры.

Ведущая организация:

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

Защита состоится «__» _____ 2019 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 (443079, г. Самара, пр. Карла Маркса, д. 165 Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (<http://www.samsmu.ru/scientists/science/referats/2019>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
кандидат фармацевтических наук

Жданова Алина Валитовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Обеспечение населения страны эффективными и безопасными лекарственными препаратами является одной из приоритетных задач фармации. Всё большую значимость приобретает создание отечественных лекарственных препаратов. Актуальны лекарственные растительные препараты (ЛРП), обладающие широким диапазоном терапевтического действия и рядом преимуществ по сравнению со средствами синтетического происхождения: относительно низкий риск развития аллергии, более мягкий терапевтический эффект и безопасность (Самылина И.А. и др., 2003, 2010; Куркин В.А., 2007, 2016).

Основными критериями для отбора растительного сырья в качестве источника биологически активных соединений являются: высокое содержание действующих веществ, доступность сырья в природе или несложная технология его культивирования. К таким растениям можно отнести лабазник вязолистный (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) и лабазник шестилепестный (*Filipendula hexapetala* Gilib.), которые широко распространены в Европейской части России и Сибири. По данным отечественных и зарубежных исследователей препараты на основе различных органов растений указанных видов обладают рядом фармакологических свойств.

На наш взгляд, одним из перспективных растительных источников получения лекарственных средств, являются плоды лабазника. Внедрение их в качестве сырья в фармацевтическое производство будет способствовать решению важной задачи рационального и комплексного использования сырьевых ресурсов страны. Но химический состав плодов лабазников изучен недостаточно. Это не позволяет успешно решать проблемы стандартизации и разработки рациональной технологии получения препаратов на основе данного сырья.

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

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

Лабазника вязолистного трава и цветки включены в ГФ ряда стран. Предложены методики стандартизации наземных органов растений, нет сведений о стандартизации плодов лабазников.

Цель работы и основные задачи исследования

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

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Анализ и систематизация литературных данных о состоянии исследований растений рода Лабазник.
2. Исследование морфолого-анатомических признаков сырья лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного.
3. Сравнительное фитохимическое исследование сырья двух видов лабазника.
4. Изучение химического состава плодов лабазника вязолистного с выделением индивидуальных веществ и их идентификацией.

5. Разработка методики качественного анализа плодов лабазника вязолистного.

6. Разработка методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в плодах лабазника вязолистного.

7. Разработка метода получения препарата «Плодов лабазника вязолистного экстракт густой».

8. Исследование биологической активности водных и водно-спиртовых извлечений из сырья двух видов лабазника.

9. Обоснование целесообразности создания лекарственных препаратов на основе плодов лабазника вязолистного.

10. Разработка проекта ФС на новый вид лекарственного растительного сырья «Лабазника вязолистного плоды».

Научная новизна. Впервые выявлены новые, не описанные ранее в литературе, морфолого-анатомические признаки плодов лабазников вязолистного и шестилепестного.

Показано, что ведущей группой БАВ плодов являются флавоноиды и количественное содержание их не ниже, чем в цветках, что свидетельствует о перспективности комплексного использования данного вида сырья.

Из плодов лабазника вязолистного, произрастающего в Самарской области выделены и идентифицированы 6 соединений, из них одно (эргостерин) - впервые из лабазника.

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

Впервые выявлено, что отвар (1:10) и настойки (1:5) плодов лабазников двух видов на 40% и 70% спирте этиловом обладают антимикробной активностью, противовоспалительным действием, а изготовленный «Плодов лабазника экстракт густой» - антидепрессантным и диуретическим. Обоснована целесообразность использования в практике нового вида ЛРС «Лабазника вязолистного плоды».

Теоретическая и практическая значимость работы

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

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

Разработан раздел «Микроскопия» для проекта ФС на новый вид ЛРС «Лабазника вязолистного плоды».

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

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

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебный процесс на кафедрах фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, используются ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», ЗАО «Самаралектравы».

Методология и методы исследования

Методология диссертационной работы основана на изучении и систематизации данных литературы по исследованию растений рода Лабазник для научного обоснования целесообразности комплексного использования растительного сырья лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного в

фармацевтической и медицинской практике, оценки актуальности и степени разработанности выбранной темы. В соответствии с поставленной целью и задачами разработан план выполнения диссертационного исследования, выбраны объекты и методы исследования.

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

Математическая обработка результатов проведена по методике, описанной в ГФ РФ XIV издания.

Связь задач исследования с планами научных работ

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

Основные положения, выносимые на защиту

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

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

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

4. Результаты исследования биологической активности водных и водно-спиртовых извлечений из сырья двух видов лабазника, препарата «Плодов лабазника вязолистного экстракт

густой» и обоснование целесообразности использования препаратов на основе плодов лабазников в медицинской и фармацевтической практике.

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

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

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

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

Внедрение результатов исследования. Полученные в результате исследований данные используются в учебном процессе на кафедрах фармацевтического факультета ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, а также в ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», ЗАО «Самаралектравы».

Личный вклад автора. Все приведенные экспериментальные результаты диссертационного исследования

получены самим автором. В результате морфологических и анатомо-гистологических исследований цветков, плодов, подземных органов лабазников двух видов выявлены диагностически значимые признаки. Из плодов выделены и идентифицированы компоненты этого ЛРС. Разработана технология получения препаратов на основе сырья двух видов лабазника, определена антимикробная и противовоспалительная активность водных и водно-спиртовых извлечений. Определена острая токсичность, диуретическая и антидепрессантная активность препарата «Плодов лабазника экстракт густой». Предложены и обоснованы методики качественного и количественного анализа препаратов на основе плодов лабазника вязолистного методами ТСХ и УФ-спектроскопии. Разработан проект ФС «Лабазника вязолистного плоды».

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Основные положения, изложенные в диссертации, соответствуют паспорту научной специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) по пункту 2: «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»; пункту 3: «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления»; пункту 5: «Изучение вопросов рационального использования ресурсов лекарственного растительного сырья с учетом влияния различных факторов на накопление биологически активных веществ в сырье» и пункту 6: «Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе».

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

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

Глава 1 содержит аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы, посвященный исследованиям сырья и препаратов растений рода Лабазник. Представлены сведения по ареалу обитания растений, химическому составу и методам стандартизации. Описаны фармакологические эффекты препаратов на их основе, которые имеют длительный положительный опыт применения в народной медицине. Обоснована актуальность запланированных исследований.

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

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

Глава 4 отражает результаты фитохимических исследований надземной и подземной частей двух видов лабазника, выделения

индивидуальных БАС из плодов лабазника вязолистного и установления их структуры.

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

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

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

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Объекты и методы исследования

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

Морфолого-анатомическое исследование сырья двух видов лабазника проводили с использованием цифровых микроскопов «Motic DM-111» и «Motic DM-39» с увеличениями x20, x40, x100, x400; люминесцентного микроскопа «Альтами ЛЮМ-2».

В ходе исследования химического состава плодов лабазника вязолистного применили метод адсорбционной жидкостной колоночной хроматографии с использованием силикагеля марки L 40/100 мкм и L 100/250 мкм (Чехия), сефадекса LH-20 (Швеция) и полиамида марки «Woelm» (Германия). Элюирование веществ осуществляли хлороформом, смесью хлороформ-этанол в различных соотношениях, спиртом этиловым 95%. Для анализа извлечений из сырья, субстанций, выделенных веществ и ЛП препаратов методом тонкослойной хроматографии использовали пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» и «Сорбфил ПТСХ-П-А-УФ» (Россия). Бумажную хроматографию (БХ) сахаров и других компонентов осуществляли на бумаге FN-11, FN-15 в нисходящем токе растворителя. Спектральные исследования проводили на спектрофотометрах «Specord 40» («Analytik Jena») и СФ-2000 («ОКБ Спектр»). ¹H-ЯМР- и ¹³C-ЯМР-спектры регистрировали на приборе «Bruker AM 300». Масс-спектры электронного удара регистрировали на приборе «Kratos MS-30».

Настойки получали методом дробной мацерации и перколяции. Густой экстракт из плодов лабазника вязолистного получали путем упаривания под вакуумом водно-спиртового извлечения (1:1). Настойки (1:5), настои и отвары из сырья двух видов лабазника проверяли на антимикробную активность в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Острую токсичность, противовоспалительную, диуретическую, антидепрессантную активности густого экстракта из плодов лабазника вязолистного проверяли на белых крысах.

2. Морфолого-анатомическое исследование

Аналізу подвергалось воздушно-сухое сырье лабазников. Исследованы цветки, плоды, подземные органы растений.

Для подтверждения подлинности плодов лабазника вязолистного определен следующий комплекс диагностически значимых признаков: переходный тип строения стели

плодоножек (**рис. 1А**); наличие в плодоножках, неравномерно расположенных лизигенных вместилищ (**рис. 1Б**); опушение

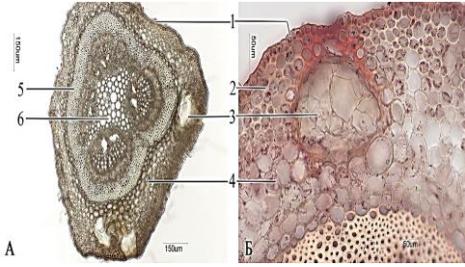


Рисунок 1 - Особенности строения плодоножки: А – общий вид до окрашивания (x100); Б – фрагмент поперечного сечения после окраски 0,5 % раствором Судана III (x400).
 Обозначения: 1 – эпидерма; 2 – колленхима; 3 – вместилище; 4 – паренхима; 5 – склеренхима; 6 – клетки основной паренхимы.

эпидермиса простыми одноклеточными трихомами; трехслойная структура перикарпия; значительное количество монокристаллов в паренхиме листовки; конусовидную форму проводящего пучка в области шва листовки (**рис. 2А**); обильный эндосперм семени, окружающий зародыш (**рис. 2**).

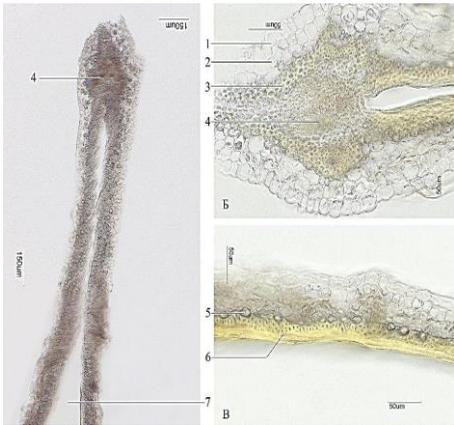


Рисунок 2 - Строение листовки на поперечном сечении: А – общий вид (x100); Б – жилка листовки, окрашенная 10% раствором серноокислого анилина (x400); В – фрагмент перикарпия, окрашенный 10% раствором серноокислого анилина (x400).

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

Для подтверждения подлинности плодов лабазника шестилепестного определены следующие диагностически значимые признаки: ретортовидные волоски, составляющие густое опушение околоцветника и многолистовки (**рис. 3**);

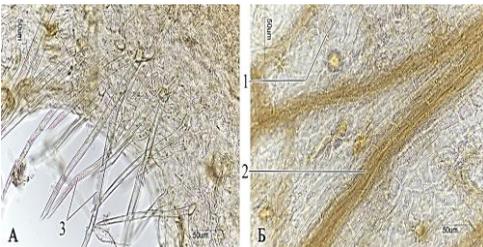


Рисунок 3 - Поперечный срез остатка околоцветника многолистовки (x400): А – фрагмент эпидермы с трихомами; Б – поверхность околоцветника.
 Обозначения: 1 – устьице; 2 – жилка; 3 – простые бичевидные волоски.

особенности проводящей системы листовки в виде одного крупного коллатерального пучка конусовидной формы, расположенного со стороны шва; многослойный эндокарпий из склеренхимных волокон; структура зародыша.

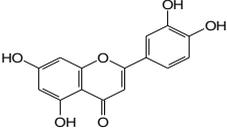
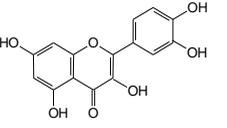
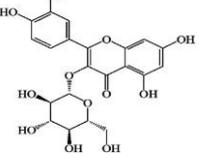
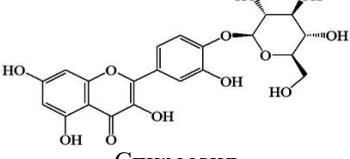
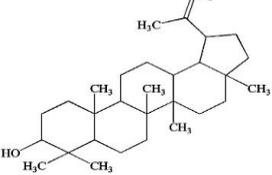
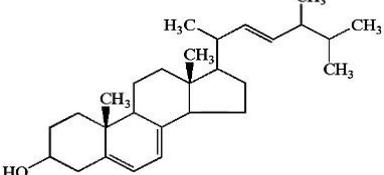
3. Фитохимическое исследование плодов лабазника

В рамках предварительного анализа проведен ряд пробирочных реакций на основные группы БАС, наличие которых можно предположить в извлечениях из растений.

Методом ТСХ водно-спиртовых извлечений из сырья лабазников вязолистного и шестилепестного выполнены качественный анализ и определение доминантного БАВ.

Методом колоночной хроматографии настойка плодов лабазника вязолистного разделена на 72 фракции, которые потом упаривали и подвергали дальнейшему исследованию. Ход элюирования контролировали визуально и методом ТСХ. Выделены 6 индивидуальных веществ (табл. 1).

Таблица 1 – Структура веществ выделенных из плодов лабазника вязолистного, произрастающего в Самарской области

 <p>Лютеолин (3',4',5,7 - тетрагидроксифлавоны)</p>	 <p>Кверцетин (3,5,7,3',4' - пентагидроксифлавоны)</p>
 <p>Изокверцитрин (3-O-β-D-глюкозид кверцетина)</p>	 <p>Спиреозид (4'-O-β-D-глюкозид кверцетина)</p>
 <p>Лулеол (фагастерол)</p>	 <p>Эргостерин (эргостерол)</p>

После перекристаллизации, определены их температуры плавления, проведена идентификация с помощью ТСХ, УФ-, ¹H-ЯМР-, ¹³C-ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии.

4. Разработка методик стандартизации плодов лабазника вязолистного

При разработке методик использовали результаты фитохимического исследования сырья двух видов лабазника, показавшие, что основную группу действующих веществ представляют флавоноиды. Содержание флавоноидов в плодах практически не уступает таковому в других органах растений, но в плодах лабазника вязолистного веществ фенольной природы (флавоноидов) больше, чем в плодах лабазника шестилепестного, поэтому в качестве перспективного ЛРС нами предложены плоды лабазника вязолистного.

Предварительно провели исследование влияния различных параметров экстракции на выход действующих веществ из сырья, определили оптимальные условия: экстрагент - 70%-ный спирт этиловый, продолжительность - 60 мин на кипящей водяной бане при соотношении «сырье-экстрагент» - 1:50.

4.1. Разработка методик качественного анализа плодов лабазника вязолистного

Для оценки подлинности плодов лабазника вязолистного нами рекомендовано применение двух методов – ТСХ и спектрофотометрии. В качестве оптимальной системы растворителей для разделения веществ водно-спиртовых извлечений плодов лабазника вязолистного в условиях ТСХ определена смесь спирт *n*-бутиловый–кислота уксусная ледяная–вода (4:1:2) с использованием стандартного образца рутина. Детекция в УФ-свете при 254 нм и 366 нм, а также обработкой реактивом ДСК.

На хроматограммах водно-спиртовых и спиртовых извлечений из плодов лабазника вязолистного обнаруживается зона вещества с $R_f = 0,50$. По характеру свечения в УФ-свете, а также по окрашиванию реактивом ДСК можно сделать вывод,

что это вещество представляет собой вещество флавоноидной природы. На хроматограмме извлечений эти пятна имеют внешнее сходство с пятном ГСО рутина, но располагаются чуть выше, что характерно для гликозидных форм флавонолов. Окраска основного вещества извлечения на 70%-ном этаноле более интенсивна по сравнению с окраской пятен других извлечений, что подтверждает оптимальность экстрагента.

В УФ-спектрах водно-спиртовых извлечений из плодов лабазника вязолистного на основе 70%-ного спирта этилового с добавлением 3%-ного раствора алюминия хлорида наблюдали батохромный сдвиг полосы поглощения, характерной для флавоноидов, и появление максимума при длине волны 412 ± 2 нм, обусловленного поглощением образующегося окрашенного комплекса (рис. 3).

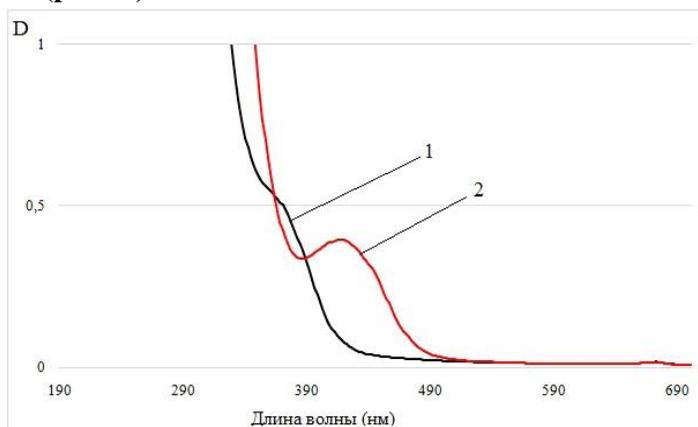


Рисунок 3 – Спектральная кривая водно-спиртового извлечения из плодов лабазника вязолистного

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

Указанный максимум на дифференциальной кривой спектра поглощения характерен для гликозидных форм флавонолов, в частности для рутина, что позволило выбрать в качестве аналитической длины волны значение 412 нм (рис. 4) и ГСО рутин в качестве стандарта в методике количественного анализа.

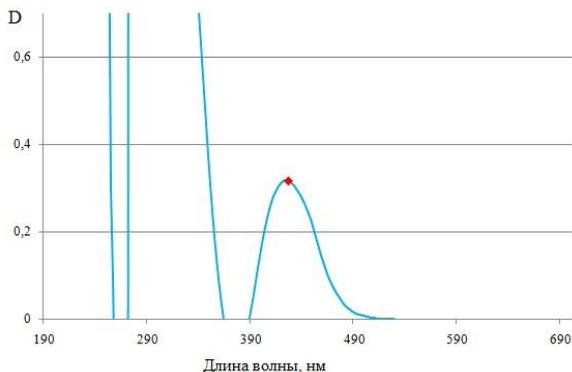


Рисунок 4 – Дифференциальная кривая водно-спиртового извлечения из плодов лабазника вязолистного

4.2. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в плодах лабазника вязолистного

Для оценки качества плодов лабазника вязолистного нами предложена методика дифференциальной спектрофотометрии с количественным определением содержания суммы флавоноидов при аналитической длине волны 412 нм в пересчете на рутин. Измерение оптической плотности извлечений проводят при длине волны 412 ± 2 нм через 60 мин после приготовления всех растворов. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

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

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

При отсутствии стандартного образца рутина целесообразно использовать теоретическое значение удельного показателя поглощения – 250.

Метрологические характеристики методики представлены в **таблице 2**.

Таблица 2 – Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в плодах лабазника вязолистного

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

Валидационную оценку методики проводили по показателям: специфичность, линейность, правильность и воспроизводимость. Специфичность методики определяли по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов плодов лабазника вязолистного и рутина с алюминия хлоридом. Линейность определяли для серии растворов рутина (с концентрациями в диапазоне от 0,0088 до 0,0352 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,9895. Правильность методики определяли методом добавок. Добавляли растворы рутина (25%, 50% и 75%) к испытуемому раствору. Средний процент восстановления составил 97%.

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

Методами перколяции, реперколяции и реперколяции с нагреванием получены образцы жидких экстрактов из плодов лабазника вязолистного с использованием в качестве экстрагента 70%-ного спирта этилового (соотношение «сырье-экстрагент» 1:1). В полученных образцах экстрактов методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 412 нм определено количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин (раствор сравнения - 96%-ный спирт этиловый). Содержание флавоноидов варьировало в пределах 1,45% – 3,90%. Максимальное значение (3,9%), позволило рекомендовать метод реперколяции с нагреванием, как оптимальный для получения жидкого экстракта.

Сгущением (упариванием) жидкого экстракта в роторно-вакуумном испарителе при температуре не выше 50⁰С получены препараты «Лабазника вязолистного экстракт густой» с более высоким содержанием флавоноидов: от (4,23±0,21)% до

(5,12±0,16)%. Для стандартизации жидкого и густого экстрактов разработаны методики спектрофотометрического анализа при длине волны 412 нм в пересчёте на ГСО рутина.

6. Изучение фармакологической активности водных и водно-спиртовых извлечений из сырья лабазника

Исследование острой токсичности и специфической фармакологической активности выполнено на базе кафедры фармакологии им. з.д.н. РФ, профессора А.А.Лебедева ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.

Исследование антибактериальной и противогрибковой активности выполнено на базе кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, предоставившей штаммы музея микробиологических культур.

Результатами исследования биологической активности подтверждена целесообразность внедрения препаратов на основе сырья лабазника в качестве лекарственных средств.

Общие выводы

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

2. Проведенное морфолого-анатомическое исследование позволило выявить особенности строения плодов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного и впервые определить диагностические признаки, характерные для плодов изучаемых растений. Результаты данного исследования включены в раздел «Микроскопические признаки» проекта ФС

на новый вид лекарственного растительного сырья «Лабазника вязолистного плоды».

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

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

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

6. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в извлечениях из плодов лабазника вязолистного в пересчете на рутин с использованием

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

7. Разработаны метод изготовления препарата «Плодов лабазника вязолистного экстракт густой» сгущением (упариванием) жидкого экстракта в роторно-вакуумном испарителе жидкого экстракта, полученного методом реперколяции с нагреванием, методики качественного и количественного определения БАВ в препарате. Предложены формулы расчёта содержания суммы флавоноидов по результатам спектрофотометрии как при наличии ГСО рутина, так и в отсутствии этого стандарта.

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

В результате микробиологического исследования выявлена антимикробная активность водных (1:10) и водно-спиртовых (1:5) извлечений из травы, цветков и плодов лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного на 40%-ном и 70%-ном этаноле в отношении грамположительных (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213) и грамотрицательных

(*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) бактерий, дрожжеподобного гриба *Candida albicans*.

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

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

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

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

Внедрение плодов двух видов лабазника в фармацевтическое производство позволит использовать весь комплекс надземных частей этих растений, достаточно распространённых в средней

полосе России, для создания лекарственных средств на их основе.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Сазанова, К.Н. Фракционный состав белков и молекулярные формы малатдегидрогеназы в траве лабазника вязолистного и шестилепестного / К.Н. Сазанова, С.Х. Шарипова // **Аспирантский вестник Поволжья**. – 2015. – №.5–6, Часть II. – С. 347 – 349.
2. Сазанова, К.Н. Морфолого-анатомическое исследование плодов лабазника шестилепестного (*Filipendula hexapetala* Gilib.) / К.Н. Сазанова, С.Х. Шарипова, В.М. Рыжов, В.А. Куркин, Л.В. Тарасенко // **Современные проблемы науки и образования**. – 2016. – № 4. - 213 с.
3. Сазанова, К.Н. Фракционный состав белков и молекулярные формы малатдегидрогеназы в плодах растений рода *Filipendula* / К.Н. Сазанова, С.Х. Шарипова // **Аспирантский вестник Поволжья**. – 2016. – №.1–2. – С. 250 – 253.
4. Сазанова, К.Н. Антимикробная активность извлечений из плодов двух видов лабазника / К.Н. Сазанова, С.Х. Шарипова, В.М. Рыжов, В.А. Куркин, А.В. Лямин // **Фармация**. - 2017. - Т. 66. - №2. - С. 47-49.
5. Сазанова, К.Н. Антимикробная активность извлечений из цветков лабазника вязолистного и шестилепестного / К.Н. Сазанова, С.Х. Шарипова, В.М. Рыжов, В.А. Куркин, А.В. Лямин // **Фармация**. - 2018. - Т. 67. - №6. - С. 46-51.
6. Сазанова, К.Н. Определение антимикробной активности водных и водно-спиртовых извлечений из травы лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного // К.Н. Сазанова, С.Х. Шарипова, А.В. Лямин // **Аспирантский вестник Поволжья**. – 2018. – №.5–6. – С. 22 – 26.
7. Сазанова, К.Н. Фракционный состав белков травы лабазника вязолистного и шестилепестного / К.Н. Сазанова, С.Х. Шарипова // **Материалы Всероссийской научной конференции студентов и молодых специалистов «Актуальные вопросы современной медицины: взгляд молодого специалиста» - ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России**. – Рязань: РИО РязГМУ, 2015. – С. 175-176.
8. Сазанова, К.Н. Определение молекулярных форм малатдегидрогеназы в плодах лабазника вязолистного и шестилепестного / К.Н. Сазанова, С.Х. Шарипова // **Материалы III международной научно-практической конференции «Современные проблемы развития фундаментальных и прикладных наук» - Прага, 2016. – С. 127-129.**
9. Сазанова, К.Н. Морфолого-анатомическое исследование подземных органов лабазника шестилепестного (*Filipendula hexapetala* Gilib.) произрастающего в Самарской области / К.Н. Сазанова, В.М. Рыжов, С.Х. Шарипова, Л.В. Тарасенко // **Материалы I Межвузовской научно-практической конференции «Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы» Самара: ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2016 г. – С. 91-101.**
10. Сазанова, К.Н. Люминесцентная микроскопия плодов лабазника шестилепестного (*Filipendula hexapetala* Gilib.) / К.Н. Сазанова // **Материалы научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые - от технологий XXI века к практическому здравоохранению».** Аспирантские чтения – 2016. – Самара, Изд-во: ООО «Типография ЦПР» - 2016. - С. 229-231.
11. Сазанова, К.Н. Исследование противовоспалительной активности водно-спиртовых извлечений из плодов лабазника / К.Н. Сазанова // **Материалы XII научно-практической конференции молодых учёных и студентов ТГМУ им. Абуали ибни**

Сино с международным участием «Роль молодежи в развитии медицинской науки», Душанбе, 28 апреля 2017 г. - С. 320.

12. Сазанова, К.Н. Морфолого-анатомические особенности строения плодов лабазника вязолистного (*Filipendula ulmaria* L.) / К.Н. Сазанова // Материалы научно - практической конференции с международным участием Аспирантские чтения – 2017 «Научные достижения молодых ученых XXI века в рамках приоритетных направлений стратегии научно-технологического развития страны» Самара, Изд-во: ООО «Офорт» - 2017. - С. 187-188.

13. Гусакова, Е.М. Люминесцентная микроскопия цветков лабазника шестилепестного (*Filipendula hexapetala* Gilib.) / Е.М. Гусакова, К.Н. Сазанова, С.Х. Шарипова, В.М. Рыжов, Л.В. Тарасенко // Материалы II Межвузовской научно-практической конференции «Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы» Самара: ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2017 г. – С. 129 – 137.

14. Соколов, Н.С. Хроматографические исследования плодов лабазника вязолистного (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) и лабазника шестилепестного (*Filipendula hexapetala* Gilib.) / Н.С. Соколов, К.Н. Сазанова, С.Х. Шарипова, В.М. Рыжов // Материалы II Межвузовской научно-практической конференции «Современные проблемы фармакогнозии» Самара: ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2017 г. – С. 123 – 138.

15. Гусакова, Е.М. Скрининговые исследования антимикробной активности водно-спиртовых извлечений из цветков лабазника вязолистного (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) и лабазника шестилепестного (*Filipendula hexapetala* Gilib.) в отношении *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa* / Е.М. Гусакова, К.Н. Сазанова, С.Х. Шарипова, В.М. Рыжов, А.В. Лямин // Материалы II Межвузовской научно-практической конференции «Современные проблемы фармакогнозии» Самара: ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2017 г. – С. 128.

16. Сазанова, К.Н. Химико-фармакогностическое исследование плодов лабазника вязолистного, произрастающего на территории Самарской области / К.Н. Сазанова // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием Аспирантские чтения - 2018 «Исследования молодых ученых в решении актуальных проблем медицинской науки и практики» Самара, ООО «Офорт»: ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава РФ, 2018. - С. 133-134.

17. Даниленко, А.А. Морфолого-анатомическое исследование подземных органов лабазника вязолистного (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.), произрастающего в Самарской области / А.А. Даниленко, К.Н. Сазанова, С.Х. Шарипова, В.М. Рыжов, Л.В. Тарасенко // Материалы III Межвузовской научно-практической конференции «Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы» Самара: ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2018 г. – С. 123 – 128.

18. Соколов, Н.С. Содержание суммы флавоноидов в стеблях и листьях лабазника вязолистного (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) и лабазника шестилепестного (*Filipendula hexapetala* Gilib.) / Н.С. Соколов, К.Н. Сазанова, С.Х. Шарипова // Материалы III Межвузовской научно-практической конференции «Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы» Самара: ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2018 г. – С. 129 – 133.

19. Гусакова, Е.М. Хроматографическое исследование цветков лабазника вязолистного и лабазника шестилепестного / Е.М. Гусакова, К.Н. Сазанова, С.Х. Шарипова // Материалы III Межвузовской научно-практической конференции с международным участием «Современные проблемы фармакогнозии» Самара: ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2018 г. – С. 100 – 103.