

На правах рукописи



Ковалёва Наталья Александровна

Фармакогностическое изучение облепихи крушиновидной листьев

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Москва - 2026

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Воронежский государственный университет»

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор

Тринеева Ольга Валерьевна

Официальные оппоненты:

Куркин Владимир Александрович – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, заведующий кафедрой

Шамилов Арнольд Алексеевич – доктор фармацевтических наук, доцент, Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России, кафедра фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов, профессор кафедры

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «15» апреля 2026 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.02 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119019, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д. 37/1 и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан « ___ » _____ 2026 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ДСУ 208.002.02

доктор фармацевтических наук, профессор



Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время активно развивается отечественная фармацевтическая отрасль, что связано, в первую очередь, с текущей экономической и политической ситуацией. Фитохимические исследования по изысканию источников для разработки новых эффективных и безопасных лекарственных растительных средств является актуальной задачей фармации. В связи с этим, необходимо также и расширение сырьевой базы для производства лекарственных препаратов (ЛП) растительного происхождения как новыми, так и ранее изученными видами лекарственных растений (ЛР) и новых морфологических групп лекарственного растительного сырья (ЛРС).

Облепиха крушиновидная – широко распространена на территории Российской Федерации (РФ). Фармакопейным видом сырья являются плоды, которые служат для получения ряда лекарственных растительных препаратов (ЛРП) на основе жирного масла. «Зеленая часть» облепихи, составляющая около 15 % от массы урожая, практически не используется, т.к. при заготовке плодов листья являются побочным продуктом, что не отвечает принципам рационального использования природных ресурсов.

Заготовка листьев одновременно со сбором плодов позволит не только оптимизировать производственный процесс (снижение побочных продуктов) с минимальными затратами, но и способствовать расширению спектра применения облепихи крушиновидной и увеличению возможной сырьевой базы для производства новых продуктов фармацевтического назначения. Согласно отечественным и зарубежным источникам, экстракты из листьев облепихи обладают широким спектром фармакологической активности. Нормативная документация (НД) в виде фармакопейной статьи (ФС) по стандартизации листьев облепихи крушиновидной в настоящее время отсутствует, а в литературе встречаются разрозненные данные по накоплению биологически активных веществ (БАВ) и анатомо-диагностическим признакам данного сырья.

Таким образом, углубленное фармакогностическое изучение листьев с оценкой возможности расширения спектра ЛРП различного фармакологического действия на их основе, следует считать актуальным.

Степень разработанности темы исследования

Состав БАВ листьев облепихи крушиновидной достаточно хорошо изучен отечественными и зарубежными учёными. Однако, в разных работах для оценки содержания одних и тех же групп БАВ листьев применялись различные методы, что затрудняет сравнительный анализ полученных результатов. Для каждого нового растительного объекта

исследования, как известно, необходимо подбирать индивидуальные условия выделения целевых групп БАВ, а, также адаптировать известные и/или разрабатывать новые методики их определения. В литературе упоминается изучение БАВ листьев, таких как дубильные вещества, флавоноиды и гидроксикоричные кислоты методами высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) и тонкослойной хроматографии (ТСХ), жирные кислоты - газовой хроматографии (ГХ), пигменты – методом спектрофотометрии в видимой области спектра. На основе данного ЛРС учеными АО «Фармцентр ВИЛАР» запатентованы технологии выделения и очистки комплекса галло-эллаготанинов, являющегося исходной субстанцией для производства зарегистрированного ЛРП «Гипорамин» с доказанной противовирусной активностью. Ряд исследований в России и за рубежом направлен на выявление новых видов фармакологической активности, таких как противовоспалительная, репаративная, антиоксидантная, антибактериальная и иммуномодулирующая. Подтверждена низкая токсичность экстрактов из листьев облепихи крушиновидной. Несмотря на рост интереса ученых во всем Мире, и особенно в странах юго-восточной Азии, к данному ЛРС, в литературе отсутствуют данные по динамике накопления БАВ на различных этапах жизни листьев растения, а также рекомендации по оптимальным периоду сбора и условиям сушки.

Цель и задачи исследования

Комплексное фармакогностическое изучение и стандартизация листьев облепихи крушиновидной как перспективного источника БАВ для научного обоснования возможности расширения номенклатуры ЛРП на их основе различного фармакологического действия.

Для реализации поставленной цели сформулированы следующие задачи исследования:

1. Провести научно-информационный обзор литературы по разработке подходов к стандартизации листьев облепихи крушиновидной, а также степени изученности состава БАВ и динамике их накопления в сырье;
2. Изучить внешние и анатомо-диагностические признаки листьев облепихи крушиновидной;
3. Определить и нормировать товароведческие показатели качества листьев облепихи крушиновидной, а также изучить особенности накопления ими экотоксикантов;
4. С применением современных физико-химических методов анализа изучить состав БАВ листьев облепихи крушиновидной на разных сроках заготовки и научно обосновать оптимальный период сбора сырья;
5. Разработать и валидировать методики определения одной из целевых групп БАВ в листьях и водно-спиртовых извлечениях на их основе (отваре, настойках и жидком экстракте) –

флавоноидов, а также дубильных веществ, лейкоантоцианов, каротиноидов, аминокислот, хлорофилловых соединений в сырье;

6. Разработать способ интенсификации выделения одной из основных групп БАВ листьев для получения более обогащенных флавоноидами экстрактов;

7. Провести прогностическую (*in silico*) оценку возможных фармакологических свойств комплекса БАВ листьев с последующим подтверждением *in vivo* и выбрать перспективные направления для дальнейшей разработки ЛРП;

8. На основе проведенных исследований разработать критерии качества листьев облепихи крушиновидной и подготовить проект современной нормативной документации для стандартизации данного сырья.

Научная новизна

С применением комплекса различных современных методов проведения микроскопии (люминесцентной, световой, а также растровой электронной микроскопии (РЭМ)) определены основные анатомо-диагностические, в том числе впервые петиолярные, признаки листьев облепихи крушиновидной. С учетом выявленных признаков разработаны показатели для определения подлинности листьев (цельных, измельченных и порошка).

Установлены особенности накопления экотоксикантов (тяжелых металлов), а также содержание радионуклидов в листьях облепихи крушиновидной. Установлено, что изученные образцы экологически безопасны и могут быть рекомендованы для массовой заготовки сырья.

Определены основные товароведческие показатели для включения их в проект ФС.

Впервые методами капиллярного электрофореза (КЭ), газожидкостной хроматографии с масс-спектральной детекцией (ГХ-МС), ТСХ, спектрофотометрии (СФМ) установлена динамика накопления комплекса БАВ листьев облепихи крушиновидной. Получены инфракрасные (ИК) спектры листьев на разных сроках заготовки и выявлены специфические полосы поглощения.

Впервые разработаны спектрофотометрические методики определения одной из целевых групп БАВ (флавоноидов) в листьях облепихи крушиновидной и жидких лекарственных формах (ЛФ) на их основе (отваре, настояках и жидком экстракте). Новизна проведенных исследований подтверждается получением патента на изобретение РФ «Способ выделения флавоноидов из лекарственного растительного сырья» (№ 2023116586 от 22.06.2023 г.).

Методом компьютерного моделирования *in silico* определены основные виды фармакологической активности и побочных действий комплекса БАВ листьев. Полученные данные по оценке потенциальных видов фармакологической активности позволяют предложить изучаемое ЛРС для разработки препаратов и биологически активных добавок (БАД), обладающих противовоспалительной, гепатопротекторной и антиоксидантной активностью.

Антиокислительная активность (АОА) извлечений на основе листьев подтверждена титриметрическим и спектрофотометрическим методами (*in vitro*). *In vivo* на модели формалинового отёка лапы крыс достоверно доказана противовоспалительная активность водного извлечения из листьев облепихи крушиновидной при пероральном применении.

Теоретическая и практическая значимость работы

В результате проведенных исследований получены новые данные о морфолого-анатомических признаках и химическом составе листьев облепихи крушиновидной. Они позволяют расширить имеющиеся литературные данные. Исследования показали перспективность использования листьев облепихи крушиновидной в качестве источника БАВ – флавоноидов и дубильных веществ. С достаточной достоверностью (*in vivo*) доказана противовоспалительная активность водного извлечения из листьев облепихи крушиновидной, что открывает перспективы для производства ЛРП для комплексной терапии различных заболеваний, сопровождающихся активацией воспалительных процессов. Даны рекомендации по срокам заготовки листьев с точки зрения максимального накопления комплекса БАВ и сохранения возможности сбора плодов растения.

На основании полученных результатов был разработан проект ФС «Облепихи крушиновидной листья» для ГФ РФ.

Методология и методы исследования

Теоретическую основу исследования составили труды российских (Мельников О.М., Верещагин А.Л., Кошелев Ю.А., Богомолова Н.И., Мотылева С.М., Яшин Я.И., Веденин А.Н., Яшин А.Я., Тарасов А.В., Бухаринова М.А., Хамзина Е.И., Кукина Т.П., Щербаков Д.Н., Генъш К.В., Тулышева Е.А., Сальникова О.И., Гражданников А.Е., Колосова Е.А.) и зарубежных (Attrey D.P., Singh A.K., Katyal J., Naved T., Jaroszewska A., Biel W., Kauppinen S., Petruneva E., Ji M., Gong X., Li X., Wang C., Li M., Usha T., Middha S.K., Goyal A.K., Karthik M., Manoj D., Faizan S., Goyal P., Prashanth H., Pande V.) ученых, работы которых помогли провести анатомо-диагностическое исследование листьев, а также определить основные возможные виды фармакологической активности для дальнейшего изучения. Методология исследования включала в себя проведение комплексного (морфолого-анатомического, химического, фармакологического) фармакогностического изучения листьев облепихи крушиновидной. В процессе выполнения диссертационной работы использовались фармакопейные методы анализа ЛРС, ЛФ и требования, методы сравнительного и документального анализа, а также комплекс физико-химических методов (спектрофотометрия, капиллярный электрофорез, газовая хроматография с масс-

детектированием, тонкослойная хроматография и масс-спектрометрия) и технологических испытаний, методы математической статистики и обработки результатов анализа.

Личный вклад автора

При непосредственном участии автора были определены цели и задачи исследования, автором проведен анализ российской и зарубежной научной литературы. Автору принадлежит ведущая роль в проведении экспериментальных исследований, статистической обработке и анализе полученных результатов исследования, написании публикаций по теме исследования. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии во всех этапах исследования: от постановки задач, их теоретической и практической реализации до обсуждения результатов в научных публикациях, докладах и внедрения их в практику. Диссертация и автореферат написаны автором лично.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты исследования морфологических и анатомо-диагностических признаков листьев облепихи крушиновидной с применением различных методов и их биометрические характеристики;
2. Результаты накопления экотоксикантов листьями облепихи крушиновидной;
3. Результаты комплексного качественного и количественного определения различных групп БАВ в листьях современными физико-химическими методами анализа, в т.ч. разработки и валидации спектрофотометрических методик;
4. Результаты стандартизации жидких водно-спиртовых ЛФ на основе листьев облепихи крушиновидной согласно фармакопейным требованиям;
5. Результаты изучения динамики накопления основных групп БАВ и рекомендуемых оптимальных сроков заготовки листьев облепихи крушиновидной;
6. Результаты прогностической оценки (*in silico* и *in vitro*) перспективных видов фармакологической активности комплекса БАВ листьев;
7. Результаты исследований *in vivo* противовоспалительной активности водного извлечения из листьев облепихи крушиновидной.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пункту 5, 6 и 7 паспорта фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Степень достоверности и апробация результатов

Оценка уровня достоверности полученных результатов и выводов определяется большим объемом проанализированной отечественной и иностранной информационной базы, проведением достаточного количества экспериментальных исследований с использованием современных физико-химических методов анализа. В работе использовалось сертифицированное оборудование, на которое выданы действующие свидетельства о поверке. Статистическая обработка результатов эксперимента, а также валидация вновь разработанных методик проводилась в соответствии с требованиями соответствующих ОФС ГФ РФ XV издания.

Основные результаты исследования доложены на конференциях: VIII Международная научно-методическая конференция «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств» (Воронеж, 2022); Международная научная конференция «Достижения и перспективы создания новых лекарственных средств растительного происхождения» (Москва, 2024); Международная научно-практическая конференция «Актуальные вопросы современной фармакогнозии» (Пятигорск, 2024); XXV Международный Съезд ФИТОФАРМ 2024 (Санкт-Петербург, 2024). Апробация результатов диссертации состоялась на межкафедральном заседании (протокол №1506-12 от 30.04.2025).

Внедрение результатов исследования

Полученные экспериментальные данные фармакогностического изучения листьев облепихи крушиновидной использованы при разработке проекта ФС «Облепихи крушиновидной листья» для ГФ РФ. Указанный проект принят ФГБУ «НЦЭСМП» к рассмотрению в установленном порядке. Подготовлена инструкция по заготовке и сушке листьев облепихи крушиновидной, утвержденная Ботаническим садом ФГБОУ ВО «ВГУ» им. проф. Б.М. Козо-Полянского (Приложение Г). Материалы диссертационного исследования рекомендованы к внедрению для проведения учебных занятий при реализации дисциплины «Фармакогнозия» и учебной практики по фармакогнозии для студентов, обучающихся по специальности 33.05.01 «Фармация» (ВО); дисциплины «Фармакогнозия» и производственной практики по фармакогнозии для ординаторов, обучающихся по специальности 33.08.03 «Фармацевтическая химия и фармакогнозия», а также при реализации профессионального модуля ПМ.01 «Лекарствоведение» (МДК «Фармакогнозия») для студентов, обучающихся по специальности 33.02.01 «Фармация» (СПО), а также при проведении научно-исследовательских работ по стандартизации и оценке качества лекарственного растительного сырья (акт внедрения №1506-26 от 20.01.2025), при проведении занятий на курсах повышения квалификации провизоров и фармацевтов по тематике фармакогностического анализа и проблем идентификации

нефармакопейных морфологических частей фармакопейных видов лекарственных растений, произрастающих на территории Центрального Черноземья (акт внедрения №1500-18 от 30.01.2025) на фармацевтическом факультете Воронежского госуниверситета, а также при реализации дисциплины «Фармацевтическая химия» для студентов, обучающихся по специальности 33.05.01 «Фармация» (ВО) на кафедре фармацевтической химии и фармацевтической технологии ФГБОУ ВО «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко (акт внедрения №25/1 от 20.01.2025).

Публикации по теме диссертации

По материалам диссертации опубликовано 30 печатных работ, в том числе 5 статей в журналах, включенных в Перечень рецензируемых научных изданий Сеченовского Университета/ Перечень ВАК при Минобрнауки России, 3 статьи в журналах, входящих в международную базу цитирования Scopus, 14 иных публикаций по результатам исследования, 1 патент на изобретение РФ и 7 публикаций в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 282 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, четырех экспериментальных глав, выводов и библиографического указателя, включающего 193 источника, в т.ч. 32 на иностранном языке, и приложений (33 страницы). Работа иллюстрирована 75 рисунками и 67 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследований

В качестве объектов исследования использовали листья облепихи крушиновидной, заготовленные в сухую погоду в мае-сентябре 2021-2024 гг. от дикорастущих мужских и женских растений на территории Воронежской области. Стадии для заготовки сырья были выбраны по наиболее примечательным признакам изменения растения: фаза завязывания плодов – фаза 1 (конец мая – начало июня), фаза единичного созревания плодов – фаза 2 (начало – середина июля), фаза массового созревания плодов – фаза 3 (конец августа – начало сентября). Растительное сырье высушивали воздушно-теневым способом.

Макро- и микроскопический анализ осуществляли в соответствии с ГФ РФ XV. Описание внешних характеристик листьев облепихи крушиновидной проводили с помощью стереомикроскопического анализа на микроскопе Биомед-2 (РФ). Микроскопическое

исследование сырья и изучение петиолярной анатомии проводили с помощью микроскопа Биомед 6.0 (РФ) с увеличением 40×, 100×, 400×. Визуализация диагностических признаков, оценка их биометрических характеристик и микрофотографии выполнялись с помощью цифровой видеокамеры «Levenhuk» С310 NG (КНР) с программным обеспечением Top View (×86). Люминесцентный анализ осуществляли с помощью микроскопа марки Микромед 3 ЛЮМ (Россия), оснащенный корпусом люминесцентной насадки с люминесцентными блоками «В»; «G» (Россия). Источником света служила высоковольтная ртутная лампа (100 Вт); спектральный диапазон возбуждения люминесценции: голубой светофильтр – 410-490 нм, наблюдение в диапазоне 515-700 нм. Пробоподготовка не проводилась. Исследование листьев методом РЭМ проводили с помощью растрового электронного микроскопа JSM-6380LV JEOL с системой микроанализа INCA 250 (ЦКП ФГБОУ ВО «ВГУ»).

Полный элементный анализ состава изучаемого сырья (стадия начала покраснения листьев) в сравнении с почвой оценивали методом хромато-масс-спектрометрии (ХМС) с индуктивно связанной плазмой («ELAN-DRC», США). Исследование содержания радионуклидов проводили на базе ФГБУ «Россельхозцентр» гамма-спектрометрическим методом.

Определение фармакопейных показателей качества таких, как зола общая и зола нерастворимая в 10%-ной хлористоводородной кислоте и влажность, экстрактивные вещества проводили в соответствии с методиками, изложенными в соответствующих ОФС ГФ РФ XV.

Качественный состав БАВ определяли общепринятыми реакциями. Дополнительное обнаружение флавоноидов, дубильных веществ, аминокислот и пигментов проводили методом ТСХ в системах растворителей этилацетат-ледяная уксусная кислота-вода (5:1:1); диэтиловый эфир-уксусная кислота-ледяная-гексан-этилацетат (20:20:20:40) до высоты подъема фронта 9 см и этилацетат-муравьиная кислота конц.-кислота уксусная-ледяная-вода (6:7,5:7,5:18) до высоты подъема фронта 7 см; н-бутанол – кислота уксусная-ледяная – вода (4:1:1); петролейный эфир-этанол (16:1); детектирование зон – в УФ-свете после обработки 5% спиртовым раствором алюминия хлорида; при дневном свете - по собственной окраске зон пигментов, а также после обработки 1% спиртовыми растворами железоаммонийных квасцов и нингидрина.

Для определения качественного и количественного состава фракции летучих БАВ использовали метод ГХ-МС (Agilent 7890B/5977A, США) (ЦКП ФГБОУ ВО «ВГУ»). Количественное определение флавоноидов, дубильных веществ, аминокислот, пигментов (каротиноидов и хлорофиллов) и лейкоантоцианов в сырье проводили по разработанным и валидированным методикам. УФ-спектры для изучаемых объектов были получены с помощью спектрофотометра СФ-2000 (Россия) в требуемых диапазонах длин волн в кварцевых кюветах толщиной 1 см. Определение витаминов группы В, аминокислотного состава и состава

органических кислот проводили методом КЭ на базе испытательного лабораторного центра АНО «НТЦ Комбикорм» (Воронеж).

ИК-спектры измельченного сырья были получены без предварительной пробоподготовки на приборе ИК-Фурье-спектрометр VERTEX 70 (Bruker, Германия) методом НПВО и последующей обработкой программой OMNIC или GRAMS 4/32 (ЦКП ФГБОУ ВО «ВГУ»).

Прогноз основных видов фармакологической активности *in silico* проводили с использованием платформы *PassOnline*. Определение АОА водных извлечений проводили по методикам, ранее запатентованным Максимовой Т.В. и Тринеевой О.В. с соавторами. Определение противовоспалительной активности водного извлечения *in vivo* проводили на модели формалинового отёка лапы крыс.

Для выбора оптимальной ЛФ на основе изучаемого сырья получали отвар, настойку и жидкий экстракт листьев облепихи крушиновидной в соответствии с требованиями к технологии, изложенными в ОФС ГФ РФ XV изд. Стандартизацию полученных экспериментальных образцов ЛФ проводили по показателям «Описание», «Сухой остаток», «Спирт этиловый», «рН», «Тяжелые металлы» на основании требований действующих ОФС. Количественное определение суммы флавоноидов в извлечениях проводили по разработанным и валидированным методикам.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изучение анатомо-диагностических признаков листьев облепихи крушиновидной

Стереомикроскопический анализ. В качестве основных диагностических признаков сырья отмечены простые многоклеточные щитковидные и щитковидно-звездчатые волоски. Видно губчатое строение эпидермиса. По жилке встречаются в основном щитковидные волоски – прижатые, буроватые, на черешке – от светло-желтого до буровато-оранжевого цвета. Редко встречаются единичные многоклеточные звездчатые волоски, состоящие из центральной клетки с отходящими в разные стороны лучами.

Люминесцентный микроскопический анализ. Методом люминесцентной микроскопии выявлены места интенсивной флуоресценции: основания щитковидных и щитковидно-звездчатых волосков как с верхней, так и с нижней стороны листа. Нижняя сторона флуоресцирует ярче, чем верхняя, так как снизу более густое опушение (Рисунок 1).

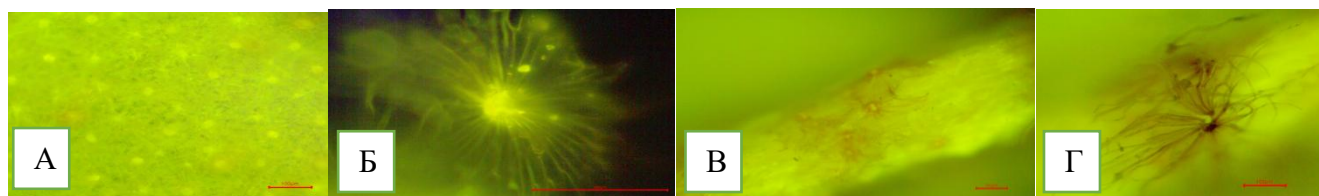


Рисунок 1 – Люминесцентная микроскопия листа облепихи крушиновидной: А – поверхность листа снизу (100×); Б - щитковидный волосок (400×); В, Г - жилка листа (снизу) 100×, 400×

Световая микроскопия. В качестве характерных признаков выделены: клетки эпидермиса верхней стороны листа многоугольной формы, с утолщёнными стенками. На нижней стороне листа клетки эпидермиса имеют сильноизвилистые стенки, устьица – аномоцитного типа. Три типа трихом – щитковидные, щитковидно-звездчатые, звездчатые. Жилка покрыта прижатыми волосками трёх видов. Тип жилкования – сетчатый.

Петиолярная анатомия. Выявлены основные анатомо-диагностические признаки строения черешка: особое очертание поперечного среза медиальной части - полукруглый профиль с уплощенной адаксиальной стороной и выпуклой абаксиальной с гиперболически сужающимися латеральными сторонами; 3 вида трихом: щитковидные, щитковидно-звездчатые и звездчатые, образующие плотный покров; проводящая система состоит из одного коллатерального, аркообразного пучка, в котором сосуды ксилемы образуют С-образное скопление, окруженное клетками флоэмы; наличие лигнифицированных элементов в проводящем пучке (Рисунок 2).

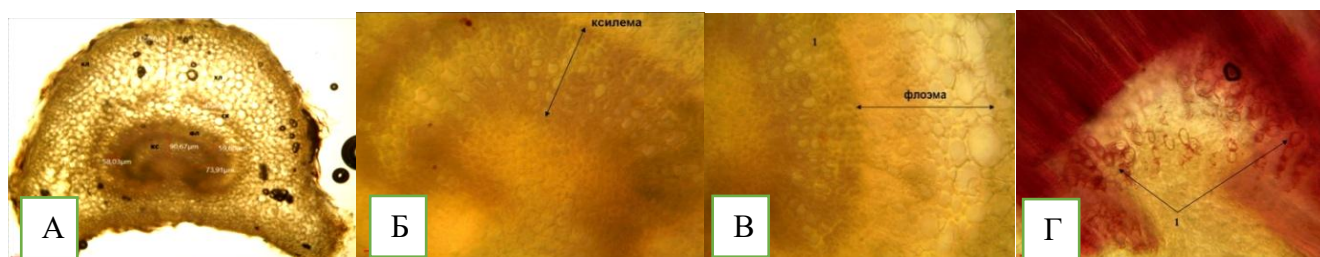


Рисунок 2 – Поперечный срез черешка листа: А –100×; Б, В– поперечный срез проводящего пучка черешка без окраски (400×); Г – поперечный срез проводящего пучка черешка листа (окрашивание флороглюцином и кислотой серной) при увеличении 400× (1 – сосуды ксилемы)

Определение товароведческих показателей

Определена вариабельность фармакопейных показателей качества: влажность, зола общая и зола, нерастворимая в растворе 10% хлористоводородной кислоты, органические и минеральные примеси в зависимости от стадии заготовки сырья (Таблица 1). Рекомендованы нормативы данных показателей для включения в НД. Предложены критерии по содержанию органических и минеральных примесей для включения в проект ФС: не более 1% и не более 0,5% соответственно.

Оценка степени накопления экотоксикантов листьями облепихи крушиновидной

В сырье установлено наличие 50 химических элементов, в числе которых практически все эссенциальные: макроэлементы, с преобладанием калия, кальция, магния и фосфора и микроэлементы, с преобладанием кремния, алюминия, железа. Содержание токсичных металлов и радионуклидов соответствует требованиям ГФ РФ XV издания (Таблица 2). Для листьев

облепихи крушиновидной, как установлено на основе данных расчета Кбп, As относится к группе элементов слабого накопления и среднего захвата. Следует рекомендовать заготовку данного ЛРС от культивируемых растений на экологически благоприятных территориях.

Таблица 1 – Товароведческие показатели качества листьев

Фаза заготовки	Влажность, %	Зола общая, %	Зола, нерастворимая в HCl, %
Исследованные образцы листьев облепихи крушиновидной			
1 (конец мая-начало июня)	7,57±0,047	4,50±0,47	0,085±0,005
2 (начало – середина июля)	7,67±0,036	5,14±0,30	0,20±0,06
3 (конец августа – начало сентября)	8,36±0,068	4,92±0,22	0,21±0,08
Рекомендуемый норматив для ФС	не более 10%	не более 6%	не более 1%

Таблица 2 – Результаты изучения накопления экотоксикантов в листьях облепихи крушиновидной

Испытуемый показатель	Содержание в листьях	ПДК для сырья	Кбп элементов	Способность к накоплению элемента
Токсичные элементы, мкг/кг				
Кадмий (Cd)	0,008	1,00	0,0002	Слабого накопления и очень слабого захвата
Ртуть (Hg)	Менее 0,0001	0,10	0,80	
Мышьяк (As)	0,54	0,50	0,33	Слабого накопления и среднего захвата
Свинец (Pb)	5,10	6,00	0,18	
Удельная активность радионуклидов, Бк/кг				
Цезий-137	менее 3*	400	-	-
Стронций-90	менее 1*	200	-	-
Примечание: *числовое значение, которое является нижним пределом чувствительности прибора, предусмотренной НД на метод испытаний.				

Качественная и количественная оценка состава БАВ листьев облепихи крушиновидной

Исследование состава БАВ листьев. В изучаемом сырье подтверждено наличие дубильных веществ, флавоноидов, сапонинов, антоциановых соединений, полисахаридов, витаминов, антраценпроизводных, аминокислот (АК), каротиноидов, хлорофилловых соединений.

Подобраны оптимальные условия разделения некоторых групп БАВ методом ТСХ, (Таблица 3). Установлено, что состав комплекса БАВ, листьев вне зависимости от стадии заготовки идентичен.

Методом ГХ-МС установлен состав фракции стеринов, сахаров, многоатомных спиртов (Таблица 4). Наибольшее количество соединений группы сахаров и стеринов характерно было для листьев фазы сбора 3 – фазы технической зрелости плодов, что обуславливается накоплением данных БАВ в процессе жизнедеятельности.

Методом КЭ исследован состав свободных и связанных аминокислот, свободных органических кислот и витаминов группы В (Таблица 5). В листьях выявлено 17 аминокислот, 7

из них являются незаменимыми. Содержание витаминов В₁, В₂, В₄ в листьях мало, что не позволяет рассматривать данное сырье в качестве источника витаминов группы В.

Таблица 3 – Обобщенные данные по результатам ТСХ-анализа БАВ листьев облепихи крушиновидной

Группа БАВ	Подвижная фаза	Тип пластин	Детектирующий реагент	Хроматографический профиль
Флавоноиды	этилацетат-ледяная уксусная кислота-вода (5:1:1)	«Silica gel 60 F254» 10×15 см	УФ-свет после обработки 10% спиртовым раствором NaOH или 5% спиртовым раствором AlCl ₃	18 зон флавоноидной природы (рутин, кверцетин и лютеолин-7-глюкозид)
Дубильные вещества	диэтиловый эфир-уксусная кислота ледяная-гексан-этилацетат (20:20:20:40); этилацетат-муравьиная кислота конц.-кислота уксусная ледяная-вода (6:7,5:7,5:18)	«Sorbfil» (ПТСХ-АФ-А) 10×10 см	1 % спиртовой раствор железоммониевых квасцов	5 зон (кверцетин и кислота галловая)
Аминокислоты	н-бутанол – кислота уксусная ледяная – вода (4:1:1)	«Sorbfil» ПТСХ-П-В, 10×15 см	1% раствор нингидрина в этаноле	11 зон (аргинин, лизин, пролин, глицин, метионин, глутаминовая кислота, фенилаланин, тирозин, валин и лейцин)
Каротиноиды и хлорофиллы	петролейный эфир-этанол (16:1)	«Sorbfil» ВЭТСХ-АФ-В 10×15 см	Видимый свет	6 зон хлорофилловой природы (хлорофиллы а, b и феофитин), 5 зон каротиноидов (β-каротин и ксантофиллы)

Таблица 4 - Идентифицированные соединения комплекса БАВ листьев облепихи крушиновидной различных фаз заготовки

Соединение	Время удерживания, мин	Содержание в общей сумме, %		
		Фаза 1	Фаза 2	Фаза 3
d-манноза	28,89	-	-	5,34
Азафрин	47,358	-	-	0,69
альфа-амирин	49,177	0,95	4,45	3,24
Аскорбилпальмитат	53,788	5,33	-	-
бета-амирин	49,48	4,55	0,56	0,41

Продолжение Таблицы 4

Бетулин	47,19	-	-	0,51
Витамин Е	47,607	0,42	0,11	0,88
гамма-ситостерол	48,933	2,0	1,69	2,56
Лактоза	26,097	-	1,06	-
Мио-инозитол, 2-С-метил-	31,748	69,69	-	-
Мио-инозитол, 4-С-метил-	31,559	-	86,66	67,54
Родопин	47,315	1,75	-	-
Фитол	34,66	-	0,21	0,5
Фитола ацетат	33,783	-	0,68	0,73
Всего соединений	41	21	16	20
Идентифицировано	30	15	12	15
Идентифицированная сумма БАВ (% от общей суммы), всего	-	84,69	95,42	82,4

Таблица 5 – Состав БАВ листьев облепихи крушиновидной по фазам заготовки

БАВ	Содержание по фазам заготовки, %							
	1	2	3	№ п/п	БАВ	1	2	3
Органические кислоты				Аминокислоты				
щавелевая	0,013	0,058	0,025	1	аргинин	0,99	0,79	0,78
муравьиная	0,188	0,165	0,342	2	лизин*	0,39	0,36	0,41
фумаровая	Менее 0,01*			3	гистидин	0,45	0,42	0,37
Янтарная				4	тирозин	0,75	0,60	0,58
Масляная				5	валин	0,31	0,27	0,26
Лимонная				6	серин	0,90	0,76	0,71
Яблочная				7	треонин	0,30	0,22	0,26
Уксусная	1,422	2,048	1,304	8	метионин*	0,06	0,05	0,03
Пропионовая	0,014	0,014	0,260	9	валин*	0,50	0,44	0,45
Молочная	0,028	0,014	0,432	10	пролин	0,83	0,84	0,74
Бензойная	0,002	0,004	0,001	11	треонин*	0,56	0,48	0,48
Сорбиновая	0,013	0,017	0,006	12	серин	0,52	0,41	0,41
Итого, %	1,68	2,32	2,37	13	аланин	0,38	0,36	0,36
Витамины группы В, мг/кг				14	изолейцин	0,52	0,47	0,47
витамин В ₁	4,63	6,93	1,17	15	цистин	0,09	0,08	0,04
витамин В ₂	1,71	2,78	2,93	16	глутаминовая кислота	0,59	0,52	0,55
витамин В ₄	171,0	94,5	88,6	17	аспарагиновая кислота	0,67	0,57	0,56
Итого, мг/кг	177,34	104,21	92,70		Всего, %	8,81	7,64	7,46

Примечание: * - нижний предел измерения

Разработка методик стандартизации листьев облепихи крушиновидной. Разработаны и валидированы методики (Таблица 6) определения флавоноидов (в пересчете на лютеолин), дубильных веществ (в пересчете на галловую кислоту (ГК) и танин), пигментов (хлорофиллов и каротиноидов), АК (в пересчете на глутаминовую кислоту) и лейкоантоциановых соединений (в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид) в листьях (Таблицы 6 и 7).

Таблица 6 – Валидационные характеристики методики определения БАВ в листьях облепихи крушиновидной

Валидационный показатель	Флавоноиды	Дубильные вещества		Аминокислоты	Лейкоантоциановые соединения	Пигменты	
		ГК	танин			каротиноиды	хлорофиллы
Линейность	$y=0,2277x+0,0391$ $R^2 = 0,9925$	$y=0,6931x - 0,0407$ $R^2 = 0,9917$	$y=0,8476x+0,0286$ $R^2 = 0,993$	$y=0,0928x+0,0129$ $R^2 = 0,9898$	$y=0,3428x+0,0218$ $R^2 = 0,9941$	$y=0,0978x - 0,0226$ $R^2 = 0,9974$	$y=0,036x+0,0012$ $R^2 = 0,9998$
Сходимость	RSD, % = 2,30 SD, % = 1,65	RSD, % = 8,03 SD, % = 1,06	RSD, % = 8,475 SD, % = 2,054	SD, % = 4,04 RSD, % = 1,88	RSD, % = 1,33 SD, % = 2,95	RSD, % = 0,107 SD, % = 1,118	RSD, % = 0,329 SD, % = 1,443
Специфичность	Спектр плацебо	Введено-найдено			Спектр плацебо		
Область линейности, г/мл	$0,086 - 3,01 \times 10^{-4}$	$0,272-1,908 \times 10^{-5}$	$0,165-1,085 \times 10^{-5}$	$0,21 - 7,36 \times 10^{-4}$	$0,17 - 2,4 \times 10^{-3}$	$0,55 - 7,74 \times 10^{-5}$	$1,32 - 18,45 \times 10^{-5}$
Межлабораторная прецизионность	RSD, % = 1,45 SD, % = 1,03	RSD, % = 18,28 SD, % = 2,37	RSD, % = 3,69 SD, % = 1,08	-	-	-	-
Предел обнаружения, г/мл	$8,6 \times 10^{-6}$	$0,272 \times 10^{-5}$	$0,155 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^{-5}$	$0,1704 \times 10^{-3}$	$0,55 \times 10^{-5}$	$1,32 \times 10^{-5}$
Предел количественного определения, г/мл	$2,38 \times 10^{-5}$	$0,816 \times 10^{-5}$	$0,465 \times 10^{-5}$	-	$0,64 \times 10^{-3}$	$5,55 \times 10^{-5}$	$15,81 \times 10^{-5}$
Аналитическая область методики, г/мл	$1,128 - 1,778 \times 10^{-4}$	$0,818-1,362 \times 10^{-5}$	$0,465-0,775 \times 10^{-5}$	-	-	$3,32-5,55 \times 10^{-5}$	$7,91-13,18 \times 10^{-5}$
Правильность	$\Delta b = 2,37 \times 0,4192 = 0,9935$ $b \leq \Delta b$ $0,0391 < 0,9935$	R, % = 104,5	R, % = 96,42	R, % = 99,66	-	-	-

Таблица 7 – Оптимальные условия выделения изучаемых групп БАВ из листьев

Параметр извлечения	Флавоноиды	Дубильные вещества		Лейкоантоциановые соединения	АК	Пигменты
		танин	ГК			
Экстрагент	70% спирт этиловый	вода очищенная		96% спирт этиловый, подкисленный HCl	вода очищенная	96% спирт этиловый
Измельченность, мм	0,2-0,5	0,2-1,0		0,5 – 1,0	1,0-2,0	Менее 0,2
Сырье: экстрагент	1:150	1:100-125		1:200	1:50	1:150-200
Время экстракции, мин	45	30-45	45-60	150	30	45-60
Кратность экстракции	1-2	1	2	1	1	2

Исследована динамика накопления различных групп БАВ в листьях облепихи крушиновидной. Листья облепихи накапливали 0,8-1,5% флавоноидов; от 7 до 9% (в пересчёте на ГК) и от 3 до 4% (в пересчёте на танин) суммы дубильных веществ; от 1,8 до 2,3% лейкоантоциановых соединений.

Исследование фармакологической активности БАВ листьев облепихи крушиновидной и стандартизация жидких водных и водно-спиртовых ЛФ на их основе

Прогноз фармакологической активности БАВ листьев *in silico*. Прогноз видов фармакологической активности полифенольных БАВ листьев *in silico* с помощью программы PASS-online показал, что наиболее перспективны для дальнейших доклинических исследований противовоспалительная, гепатопротекторная, кардиопротекторная, антибактериальная и противогрибковая активности, что открывает перспективы с целью расширения перечня показаний к применению извлечений из листьев облепихи крушиновидной в клинической практике.

Определение противовоспалительной активности водного извлечения *in vivo* проводили на модели формалинового отёка лапы крыс. Доказано, что отвар листьев облепихи крушиновидной при краткосрочном курсовом (7 сут.) пероральном введении в дозе 10 мл/кг (235 мг/кг из расчета по сухому остатку) проявляет достаточный противовоспалительный эффект, обеспечивая значительное, достоверное снижение выраженности отёка лапы крыс, максимально через 3 ч после введения флогогена на 36,0% по сравнению с контролем (Таблица 8), что превышает эффективность препарата сравнения (настой цветков ромашки).

Таблица 8 – Результаты определения выраженности отёка лапы крыс

Показатель	Контрольная группа	Настой цветков ромашки	Отвар листьев облепихи
Объём лапы, исходно V_0 , см ³	1,03±0,027		
Объём лапы через 1 ч, V_1 , см ³	1,34±0,024 ⁺⁺⁺	1,44±0,053 ⁺⁺⁺	1,29±0,033 ⁺⁺⁺

Продолжение Таблицы 8

Объём лапы через 3 ч, V_3 , см ³	1,63±0,046 ⁺⁺⁺	1,55±0,046 ⁺⁺⁺	1,26±0,042 ⁺⁺⁺ , ***
Отек лапы, через 1 ч, разница с исходным, %	+30,2	+39,5	+24,7
Отек лапы, через 3 ч, разница с исходным, %	+57,9	+50,5	+21,9
Эффективность (разница с контролем, 1 ч), %	-	-	5,5
Эффективность (разница с контролем, 3 ч), %	-	7,4	36,0
Примечание: + - P<0,05; ++ - P<0,01; +++ - P<0,001 – достоверность различий при сравнении между опытными и контрольными показателями с исходными значениями; * - P<0,05; ** - P<0,01; *** - P<0,001 – достоверность различий при сравнении между опытными и контрольными показателями			

Выбор оптимальных ЛФ. На основе изучаемых листьев получены опытные образцы ЛФ: отвар (1:10), настойка (1:5) и экстракт жидкий (1:1). По результатам стандартизации и оценки содержания целевых групп БАВ в качестве оптимальной ЛФ из исследованных может быть рекомендован экстракт жидкий (Таблица 9).

Таблица 9 – Результаты стандартизации ЛФ на основе листьев облепихи крушиновидной

Показатель	Отвар	Настойка 1:5 (простая мацерация)	Настойка 1:5 (дробная мацерация)	Настойка 1:5 (перколяция)	Экстракт жидкий 1:1
Сухой остаток	2,65%	3,77%	4,76%	3,93%	18,17%
pH водного извлечения	5,662	-	-	-	-
Спирт этиловый, об.%	-	64,0	62,27	60,0	67,0
Тяжелые металлы	-	Не более 0,001%			Не более 0,01%
Сумма флавоноидов,%	0,052± 0,003	0,094± 0,004	0,128± 0,003	0,132± 0,001	0,489±0,002

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время на основе листьев облепихи крушиновидной зарегистрирован только один ЛРП «Гипорамин». Однако, по большей части, изучаемое сырье продолжает оставаться побочным продуктом при заготовке плодов. Ежегодные запасы их значительны, так как площади культивирования данного растения на территории РФ, по литературным данным, составляют более 55 тыс. га, а естественные заросли занимают более 145 тыс. га. Листья облепихи крушиновидной могут быть использованы в качестве перспективного источника БАВ для разработки на их основе различных ЛРП и БАД противовоспалительного, капилляропротекторного и антиокислительного действия с дальнейшей оценкой *in vivo* на этапе доклинических исследований в рамках решения задач по разработке эффективных и безопасных лекарственных препаратов Российского производства.

По результатам комплексного исследования состава с оценкой динамики накопления различных групп БАВ в листьях облепихи крушиновидной (Таблица 10), проведенного в работе, установлено, что листья накапливали 0,8-1,5% флавоноидов; более 10% (в пересчёте на танин) суммы дубильных веществ; от 1,8 до 2,3% лейкоантоциановых соединений.

Таблица 10 – Сводные данные по результатам исследования состава БАВ листьев

Группа БАВ	Содержание БАВ по фенофазам, %		
	1	2	3
Экстрактивные вещества, извлекаемые 70% спиртом этиловым	38,53±1,927	39,34±1,967	43,20±2,160
Сумма флавоноидов	1,431±0,033	0,941±0,022	0,803±0,018
Дубильные вещества в пересчёте на кислоту галловую (СФ)	9,120±0,236	7,783±0,201	8,216±0,213
Содержание дубильных веществ в пересчёте на танин (СФ)	4,175±0,210	3,540±0,178	3,083±0,155
Сумма свободных аминокислот	2,957±0,143	2,145±0,104	1,727±0,084
Сумма лейкоантоцианов	2,188±0,065	2,355±0,070	1,847±0,055
Содержание каротиноидов	0,050±0,00005	0,043±0,00005	0,070±0,00008
Содержание хлорофиллов	0,163±0,0005	0,123±0,0004	0,179±0,0006
Тиамин (В1)	4,63±0,463	6,93±0,693	1,17±0,117
Рибофлавин (В2)	1,71±1,71	2,78±0,278	2,93±0,293
Холин (В4)	171,0±17,1	94,5±9,45	88,6±8,86
АОА, мг/г в пересчете на кверцетин	14,50±0,253	14,07±0,343	15,77±0,331
АОА, мг/г в пересчете на кислоту аскорбиновую	124,79±2,177	121,06±2,952	135,69±2,846
Сумма свободных органических кислот	2,372±0,0417	2,414±0,0192	2,394±0,0507
Сумма дубильных веществ (методика ОФС)	10,664±0,595	10,725±0,192	10,573±0,277
Аскорбиновая кислота	0,136±0,0104	0,142±0,0061	0,154±0,0040

Выявлено, что содержание суммы дубильных веществ на протяжении всего периода наблюдений остается стабильным без тенденции к значительному снижению. Увеличение содержания в листьях к периоду созревания плодов наблюдалось для аскорбиновой кислоты, рибофлавина и каротиноидов, что сопровождалось ростом общей АОА извлечений из сырья.

С точки зрения накопления флавоноидов, по результатам исследований, установлено снижение их содержания в сырье с июня по конец августа – начало сентября. При использовании в производстве разработанного в работе способа УЗ-обработки, к заготовке и использованию в промышленных масштабах могут быть рекомендованы, по аналогии с ЛРП «Гипорамин», также листья всех изученных фенологических фаз, для которых содержание суммы флавоноидов достигает 1%. Данный подход позволит наиболее рационально использовать листья растения с целью возможности производства не только известного противовирусного ЛРП, не снижая требований к его качеству, но и дать возможность расширения ассортимента препаратов и БАД

на основе листьев с другими видами фармакологической активности, обусловленной группой флавоноидов.

В виду того, что листья продемонстрировали достаточно высокое содержание таннинов (более 10%) на всех этапах своего развития (снижение содержания суммы дубильных веществ в пересчете на галловую кислоту в листьях не превышает 10%), к заготовке могут быть рекомендованы листья разных сроков сбора, в т.ч. поздних (фаза 3 – массового плодоношения (технической зрелости плодов)). Следует также принимать во внимание, что заготовка листьев совместно с плодами максимально позволит сохранить уникальный комплекс БАВ в плодах, широко используемых для промышленного производства ЛРП, что соответствует принципу рационального использования природных ресурсов. По результатам работы предложена схема заготовки листьев облепихи крушиновидной (Рисунок 3).

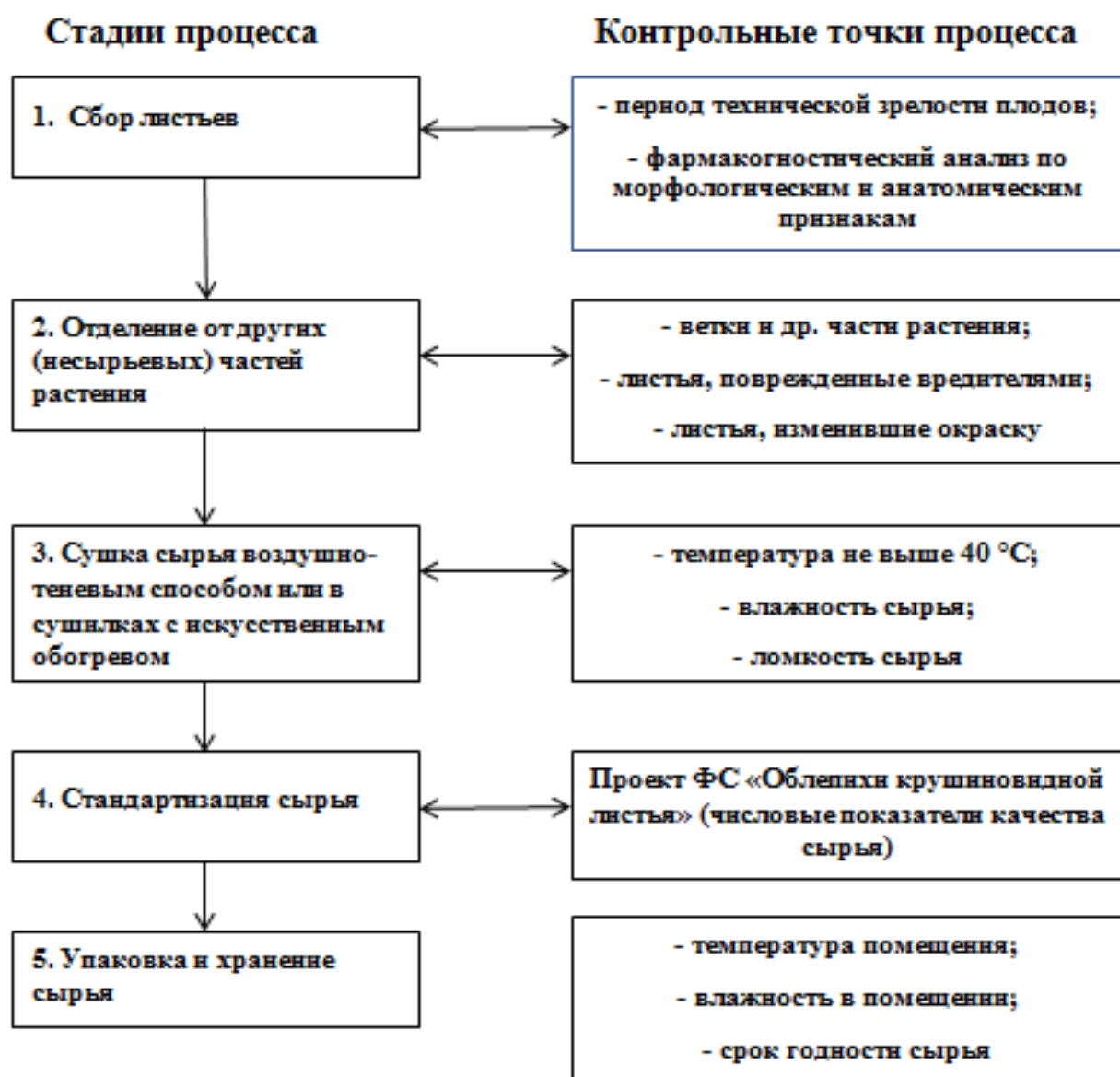


Рисунок 3 – Технологическая схема заготовки листьев облепихи крушиновидной

Таким образом, оптимальным рекомендованным периодом для заготовки листьев облепихи крушиновидной является период массового плодоношения (фенофаза 3 – конец августа – начало сентября). Содержание же целевых групп БАВ фенольной природы для листьев облепихи крушиновидной, заготовленных на территории Центрального Черноземья (на примере Воронежской области), на данном этапе также можно считать высоким (флавоноидов – не менее 0,5%; дубильных веществ – не менее 10% (в пересчете на танин); лейкоантоциановых соединений – не менее 1,5%).

Также в данной работе научно обоснована перспективность применения экстрактов листьев облепихи крушиновидной для расширения ассортимента и получения различных ЛРП, в т.ч. противовоспалительного действия. Разработаны критерии оценки качества листьев облепихи крушиновидной и проект современной нормативной документации (ФС) для их стандартизации.

Для дальнейшего выявления variability накопления БАВ листьями облепихи крушиновидной целесообразно проведение исследований сырья, заготовленного в других эколого-географических зонах, различных сортов, а также с учётом разделения мужских и женских особей, а также динамики накопления БАВ в течении нескольких лет в листьях изучаемого региона.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведенный научно-информационный обзор литературы по теме показал отсутствие фармакопейного стандарта качества на листья облепихи крушиновидной, как исходного сырья для получения ЛРП, а также отсутствие научных обоснований к срокам заготовки данного сырья с учетом динамики накопления различных групп БАВ;

2. В результате комплексного морфолого-анатомического анализа листьев облепихи крушиновидной установлены диагностические признаки, позволяющие проводить идентификацию данного сырья: клетки эпидермиса верхней стороны листа многоугольной формы, с утолщёнными стенками; на нижней стороне листа клетки эпидермиса имеют сильноизвилистые стенки, а также устьица аномоцитного типа; характерны три типа трихом – щитковидные, щитковидно-звездчатые, звездчатые;

3. Предложены нормативы товароведческих показателей качества листьев облепихи крушиновидной: влажность – не более 10 %, зола общая – не более 6 %, зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте – не более 1 %; а также по результатам оценки способности сырья к накоплению токсичных элементов и радионуклидов показана его экологическая безопасность;

4. С применением современных физико-химических методов (СФМ, ГХ-МС, капиллярный электрофорез, ТСХ и др.) изучен состав БАВ (флавоноиды, дубильные вещества,

аминокислоты, пигменты, органические кислоты и др.) листьев облепихи крушиновидной различных фенологических фаз и установлен оптимальный срок заготовки листьев облепихи крушиновидной (фаза массового плодоношения);

5. Разработаны и валидированы спектрофотометрические методики определения содержания в листьях и жидких водно-спиртовых ЛФ на их основе (отваре, настойке, жидком экстракте) суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин (не менее 0,5%), как одной из целевых групп БАВ для стандартизации и оценки качества сырья. Дополнительно разработаны и валидированы методики количественного определения суммы дубильных веществ в пересчете на кислоту галловую и танин (не менее 6% (в пересчете на кислоту галловую) и не менее 3% (в пересчете на танин)), аминокислот в пересчете на кислоту глутаминовую (не менее 2%), лейкоантоцианов в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид (не менее 1,5 %), хлорофиллов и каротиноидов (не менее 0,2% и 0,05% соответственно).

6. Впервые использован метод озвучивания для интенсификации экстракции флавоноидов, как целевой группы БАВ, из листьев облепихи крушиновидной, позволивший сократить время экстракции, снизить расход экстрагента и энергозатраты, а также увеличить выход флавоноидов на 30% (с 1,4% до 1,83%);

7. Методом *in silico* проведена прогностическая оценка возможных фармакологических свойств комплекса БАВ листьев полифенольной природы и выбраны перспективные направления для дальнейшей разработки ЛРП (противовоспалительного, гепатопротекторного, а также антибактериального действия). *In vivo* на модели формалинового отека лапы крыс достоверно показано наличие противовоспалительной активности водного извлечения из листьев облепихи крушиновидной при пероральном применении;

8. Разработаны критерии оценки качества листьев облепихи крушиновидной и проект современной НД (ФС) для их стандартизации.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Оценка антиокислительной активности облепихи крушиновидной листьев титриметрическим методом / **Н.А. Ковалёва**, О.В. Тринеева, Д.К. Носова, А.И. Колотнева // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. – 2022. – № S9. – С. 80-84.

2. Изучение морфологических признаков листьев облепихи крушиновидной методами люминесцентной и стереомикроскопии / **Н.А. Ковалёва**, О.В. Тринеева, А.А. Гудкова, А.И. Сливкин // **Разработка и регистрация лекарственных средств**. – 2022. – Т. 11, № 1. – С. 123-131. [Scopus]

3. Петиолярная анатомия листьев облепихи крушиновидной / **Н.А. Ковалёва**, О.В. Тринеева, В.В. Негроров, А.И. Колотнева, Д.К. Носова, А.И. Сливкин // **Биофармацевтический журнал**. – 2022. – Т. 14, № 6. – С. 10-15.

4. Определение экстрактивных веществ в листьях облепихи крушиновидной / **Н.А. Ковалёва**, О.В. Тринеева, Д.К. Носова, А.И. Колотнева // **Вестник Воронежского**

государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2022. – № 1. – С. 105-109.

5. Изучение микродиагностических признаков облепихи крушиновидной листьев / **Н.А. Ковалёва**, О.В. Тринеева, А.А. Гудкова, А.И. Колотнева, Д.К. Носова // **Фармация**. – 2022. – Т. 71, № 3. – С. 18-23.

6. **Ковалева, Н.А.** Исследование состава пигментов (каротиноидов и хлорофиллов) листьев облепихи крушиновидной методом ТСХ / **Н.А. Ковалева**, О.В. Тринеева, А.И. Сливкин // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2022. – Т. 22, № 3. – С. 284-298.

7. **Ковалева, Н.А.** Исследование элементного состава облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) листьев / **Н.А. Ковалева**, О.В. Тринеева // Микроэлементы в медицине. – 2022. – Т. 23, № 3. – С. 45-58.

8. Определение содержания органических кислот в листьях облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) / **Н.А. Ковалёва**, О.В. Тринеева, А.И. Колотнева, Д. К. Носова // VolgaMedScience: Сборник тезисов VIII Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием, Нижний Новгород, 17–18 марта 2022 года. – Нижний Новгород: ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, 2022. – С. 660-662.

9. Строение черешка листа облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) / **Н.А. Ковалёва**, В.В. Негрбов, О.В. Тринеева, А.И. Колотнева, Д.К. Носова // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств: Сборник трудов 8-й Международной научно-методической конференции, Воронеж, 31 марта – 02 апреля 2022 года / Под общей редакцией А.С. Беленовой, А.А. Гудковой. – Воронеж: ВГУ, 2022. – С. 280-284.

10. Исследование состава биологически активных веществ облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) листьев / **Н.А. Ковалёва**, О.В. Тринеева, Д.К. Носова, А.И. Колотнева // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств: Сборник трудов 8-й Международной научно-методической конференции, Воронеж, 31 марта – 02 апреля 2022 года / Под общей редакцией А.С. Беленовой, А.А. Гудковой. – Воронеж: ВГУ, 2022. – С. 270-279.

11. **Ковалёва, Н.А.** Внешние признаки измельченного и порошкованного сырья облепихи крушиновидной листьев / **Н.А. Ковалёва**, А.И. Колотнева, Д.К. Носова // Innovative research projects: Сборник статей Международного научно-исследовательского конкурса, Петрозаводск, 14 февраля 2022 года. – Петрозаводск: Международный центр научного партнерства «Новая Наука» (ИП Ивановская И.И.), 2022. – С. 202-205.

12. Разработка и валидация методики количественного определения флавоноидов в листьях облепихи крушиновидной методом спектрофотометрии / **Н.А. Ковалёва**, О.В. Тринеева, И.В. Чувилова, А.И. Сливкин // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2023. – Т. 13, № 2. – С. 216-226.

13. Фармакологическая активность облепихи крушиновидной листьев: *in silico u in vivo* / **Н.А. Ковалёва**, О.В. Тринеева, А.В. Бузлама, А.Ю. Кузнецов // **Разработка и регистрация лекарственных средств**. – 2023. – Т. 12, № 3. – С. 174-188. [Scopus]

14. **Ковалёва, Н.А.** Применение растровой электронной микроскопии для изучения морфолого-анатомических признаков облепихи крушиновидной листьев / **Н.А. Ковалёва**, О.В. Тринеева // **Разработка и регистрация лекарственных средств**. – 2023. – Т. 12, № 2. – С. 79-86. [Scopus]

15. **Ковалёва, Н.А.** Разработка и валидация методики количественного определения каротиноидов и хлорофиллов в листьях облепихи крушиновидной / **Н.А. Ковалёва**, О.В. Тринеева, А.И. Колотнева // **Вестник Смоленской государственной медицинской академии**. – 2023. – Т. 22, № 4. – С. 199-207.

16. **Ковалева, Н.А.** Разработка и валидация методики определения аминокислот в листьях облепихи крушиновидной / **Н.А. Ковалева**, О.В. Тринеева, А.И. Сливкин // Биофармацевтический журнал. – 2023. – Т. 15, № 1. – С. 47-52.

17. Маркетинговый анализ Российского рынка противовирусных лекарственных препаратов / **Н.А. Ковалёва**, О.В. Тринеева, И.А. Занина, Д.К. Носова, А.И. Колотнева // **Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация.** – 2023. – № 3. – С. 66-76.
18. Определение некоторых биологически активных веществ в листьях облепихи крушиновидной титриметрическими методами / **Н.А. Ковалева**, О.В. Тринеева, И.В. Чувицова, А.И. Колотнева, Д.К. Носова // **Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация.** – 2023. – № 2. – С. 97-102.
19. Тринеева, О.В. Исследование состава биологически активных веществ облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) листьев методом ГХ-МС / О.В. Тринеева, **Н.А. Ковалёва** // Химия растительного сырья. – 2023. – № 4. – С. 219-229.
20. Исследование состава органических кислот в листьях облепихи крушиновидной (*Hippophae rhamnoides* L.) / **Н.А. Ковалева**, О.В. Тринеева, И.В. Чувицова, Е.Ф. Сафонова // Химия растительного сырья. – 2023. – № 3. – С. 211-219.
21. Применение ТСХ для оценки профиля флавоноидов листьев облепихи крушиновидной различных фаз заготовки / О.В. Тринеева, **Н.А. Ковалева**, Е.Ф. Сафонова, А.И. Сливкин // Сорбционные и хроматографические процессы. – 2023. – Т. 23, № 4. – С. 547-557.
22. **Ковалева, Н.А.** Состав витаминов группы В в листьях облепихи крушиновидной / **Н.А. Ковалева**, О.В. Тринеева // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств: Сборник трудов 9-ой Международной научно-методической конференции. Посвящается 25-летию создания фармацевтического факультета в Воронежском государственном университете, Воронеж, 28–29 сентября 2023 года / Под общей редакцией А.С. Беленовой, А.А. Гудковой, Н.А. Дьяковой. – Воронеж: ВГУ, 2023. – С. 271-274.
23. **Ковалёва, Н.А.** Оценка радиационной безопасности листьев облепихи крушиновидной / **Н.А. Ковалёва**, И.В. Давыдов // Инновационный потенциал развития общества: взгляд молодых ученых: сборник научных статей 4-й Всероссийской научной конференции перспективных разработок, Курск, 01 декабря 2023 года. – Курск: ЗАО «Университетская книга», 2023. – С. 78-80.
24. Применение ультразвуковой экстракции для выделения флавоноидов из листьев облепихи крушиновидной / **Н.А. Ковалёва**, О.В. Тринеева, И.В. Чувицова, Н.А. Дьякова // Биофармацевтический журнал. – 2024. – Т. 16, № 1. – С. 12-18.
25. **Ковалёва, Н.А.** Получение и стандартизация лекарственных растительных препаратов на основе листьев облепихи крушиновидной / **Н.А. Ковалёва**, О.В. Тринеева, А.В. Выдрин // XXV Международный Съезд ФИТОФАРМ 2024: сборник тезисов, Санкт-Петербург, 07–09 октября 2024 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, 2024. – С. 81-82.
26. Патент №2813186 С1 Российская Федерация, МПК А61К 36/72, В01D 11/00. Способ выделения флавоноидов из лекарственного растительного сырья: № 2023116586: заявл. 22.06.2023: опубл. 07.02.2024 / **Н.А. Ковалёва**, О.В. Тринеева, Н.А. Дьякова, И.В. Чувицова; заявитель федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет».
27. **Ковалёва, Н.А.** Разработка и валидация спектрофотометрической методики количественного определения дубильных веществ в листьях облепихи крушиновидной / **Н.А. Ковалёва**, О.В. Тринеева, И.В. Давыдов // Биофармацевтический журнал. – 2024. – Т. 16, № 4. – С. 42-48.
28. Пугачева О.В., Изучение комплекса биологически активных веществ листьев аронии Мичурина (*Aronia × mitschurinii* A.K. Skvortsov & Maitul) и облепихи крушиновидной (*Hippophaes rhamnoides* L.) / О.В. Пугачева, О.В. Тринеева, **Н.А. Ковалева** // Химия растительного сырья. – 2025. - №1. - С. 227–237.
29. Определение антиокислительной активности листьев облепихи крушиновидной / **Н.А. Ковалева**, О.В. Тринеева, И.В. Чувицова, А.И. Колотнева // Гербариум. – 2025. Т. 2, №2. - С. 9-16.

30. Ковалева Н.А., Разработка и валидация спектрофотометрической методики количественного определения антоцианов в листьях облепихи крушиновидной / Н.А. Ковалева, О.В. Тринеева, И.В. Чувилова // Химия растительного сырья. – 2025. - №2. - С. 130-138.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АОА – антиокислительная активность
АК - аминокислота
БАВ – биологически активные вещества
БАД – биологически активные добавки
ГК – галловая кислота
ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации
ГХ-МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектором
ИКС – инфракрасная спектроскопия
Кбп – коэффициент биологического поглощения
КЭ – капиллярный электрофорез

ЛП – лекарственный препарат
ЛРП – лекарственный растительный препарат
ЛРС – лекарственное растительное сырье
ЛФ – лекарственная форма
МС – масс-спектрометрия
НД – нормативная документация
ОФС – общая фармакопейная статья
РФ – Российская Федерация
ТСХ – тонкослойная хроматография
СО – стандартный образец
СФМ – спектрофотометрия
ФС – фармакопейная статья