

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Сулейманова Фидан Ширин кызы

**Разработка и совершенствование методов контроля качества
лекарственного растительного сырья травы золотарника канадского и
определение его биологической активности**

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук, профессор
Нестерова Ольга Владимировна

Москва – 2020

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Этиология, патогенез и классификация воспалительных заболеваний пародонта.....	12
1.2. Фитопрепараты, используемые в стоматологии для профилактики и лечения воспалительных заболеваний пародонта.....	14
1.3. Ботаническая характеристика, химический состав и применение золотарника канадского	21
1.4. Химический состав золотарника канадского.....	23
1.4. Применение золотарника канадского в народной и научной медицине 26	
1.6. Перспективность создания отечественных препаратов на основе золотарника канадского для профилактики и лечения воспалительных заболеваний пародонта	33
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	34
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
2.1. Объекты исследования, их характеристика	35
2.2. Макроскопический и микроскопический анализ	35
2.3. Идентификация ЛРС и его фитохимический анализ.....	36
2.3.1. Профиль ЯМР-спектроскопии ЛРС	36
2.3.2. Дубильные вещества	37
2.3.3. Органические кислоты.....	41
2.3.4. Флавоноиды.....	42
2.3.5. Гидроксикоричные кислоты	46
2.3.6. Полисахариды.....	48
2.4. Минеральный состав	48
2.5. Методы стандартизации сырья.....	50
2.6. Методы стандартизации спирто-водных извлечений	52
2.7. Методы исследований биологической активности	53
2.8. Статистическая обработка данных.....	55

ГЛАВА 3. МАКРОСКОПИЧЕСКОЕ И МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЯ	56
3.1. Описание сырья травы золотарника канадского	56
3.2. Описание микроскопии травы золотарника канадского	58
3.2.1. Описание микроскопии листа.....	58
3.2.2. Микроскопия стебля	60
3.2.3. Микроскопия соцветия	61
3.3. Микроскопия порошка.....	64
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	66
ГЛАВА 4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАВЫ ЗОЛОТАРНИКА КАНАДСКОГО ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ	67
4.1. Профиль ЯМР-спектроскопии травы золотарника канадского	67
4.2. Фитохимическое изучение сырья золотарника канадского	70
4.2.1. Качественное и количественное определение дубильных веществ	73
4.2.2. Качественное и количественное определение содержания свободных органических кислот	76
4.2.3. Качественное и количественное определение флавоноидов	78
4.2.5. Качественное и количественное определение гидроксикоричных кислот.....	87
4.2.6. Качественное и количественное определение полисахаридов	94
4.2.7. Качественное и количественное определение минеральных веществ	95
4.3. Разработка показателей качества сырья золотарника канадского для изготовления спирто-водных извлечений	100
4.3.1. Определение числовых показателей сырья	100
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	107
ГЛАВА 5 ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗВЛЕЧЕНИЙ И РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАВ ИЗ ТРАВЫ ЗОЛОТАРНИКА КАНАДСКОГО	109
5.1. Исследование водного извлечения из травы золотарника канадского	109
5.2. Исследование спирто-водного извлечения из сырья трава золотарника канадского	110

5.2.1 Исследование влияний изменения технологических параметров на выход БАВ.....	113
5.2.2. Изучение состава спирто-водных извлечений методом ТСХ.....	115
5.2.3. Количественное определение флавоноидов в спирто-водном извлечении травы золотарника канадского	116
5.2.4. Показатели качества спирто-водного извлечения из травы золотарника канадского	119
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5	121
ГЛАВА 6 ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТРАВЫ ЗОЛОТАРНИКА КАНАДСКОГО ИЗВЛЕЧЕНИЙ НА ЕГО ОСНОВЕ	122
6.1. Изучение антиоксидантной активности сырья травы золотарника канадского	122
6.2. Изучение антиоксидантной активности спирто-водного извлечения из травы золотарника канадского	123
6.3. Изучение антибактериальной активности спирто-водного извлечения из травы золотарника канадского.....	125
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6	127
ОБЩИЕ ВЫВОДЫ	128
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	130
ЛИТЕРАТУРА.....	131
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	148
Приложение 1	148
Приложение 2	149
Приложение 3	150
Приложение 4	151
Приложение 5	152
Приложение 6	153
Приложение 7	154

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Важным направлением научных исследований является поиск лекарственного растительного сырья (ЛРС), сочетающего противовоспалительное, антиоксидантное и антибактериальное действие с целью последующей разработки средств для лечения и профилактики воспалительных заболеваний полости рта. Заболевания пародонта по данным ВОЗ являются одним из распространенных заболеваний. В настоящее время предлагаются лекарственные средства с различным механизмом действия для профилактики и местного лечения воспалительных заболеваний полости рта, однако вследствие развития аллергических реакций и индивидуальной непереносимости многие антибактериальные препараты имеют ограниченное применение, особенно у категории больных детского и пожилого возраста.

Перспективным родом лекарственных растений с противовоспалительной активностью является *Solidago* (Золотарник). По литературным сведениям антибактериальным действием обладает *Solidago canadensis* L.

По данным Kolodziej B., Kowalski R., Kedzia B. водно-спиртовые извлечения из травы *Solidago canadensis* L. проявляют выраженное антибактериальное действие в отношении грамположительных (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus feacalis*, *Bacillus subtilis*) и грамотрицательных бактерий (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*). Учитывая, что растительные антибактериальные средства не вызывают привыкания, использование профилактического средства на основе извлечения из травы *Solidago canadensis* L. является актуальным и перспективным.

В связи с этим необходимо осуществить комплексное исследование золотарника канадского, направленное на изучение макро- и микродиагностических признаков сырья, химического состава сырья и водных и спирто-водных извлечений, позволяющее оптимизировать

нормативную документацию на изучаемое сырье, произвести оценку использования разрабатываемых методов анализа и стандартизации извлечений из сырья.

Степень разработанности темы исследования

В настоящее время имеется фармакопейная статья на траву золотарника канадского, однако методы идентификации и количественного определения не совершенствовались в течение нескольких лет. На основе золотарника канадского созданы препараты, преимущественно для лечения и профилактики заболеваний мочеполовой системы (Простанорм, Марелин, Фитолизин, Урофлюкс, Цистиум солидаго). В 1991 году была выпущена фармакопейная статья на траву золотарника канадского – *Herba Solidaginis canadensis*, которая на сегодняшний день не соответствует требованиям действующей Государственной фармакопеи (ГФ). Содержание суммы групп биологически активных веществ (БАВ) и их компонентный состав в траве золотарника изучены мало.

Цель работы и основные задачи исследования

Цель диссертационной работы - разработка и совершенствование методик качественного и количественного анализа лекарственного растительного сырья травы золотарника канадского.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести анализ научной литературы, определяющей современное состояние исследований травы золотарника канадского и соответствие современным требованиям стандартизации.

2. Провести углубленное морфолого-анатомическое исследование сырья травы золотарника канадского, включающих исследование листьев, стебля, цветков золотарника канадского с целью установить наиболее значимые диагностические признаки цельного, измельченного сырья и порошка травы золотарника канадского.

3. Изучить фитохимический состав сырья золотарника канадского для определения основных групп БАВ при стандартизации лекарственных растительных средств.

4. Провести исследование по разработке методик качественного и количественного определения групп БАВ, определенных в сырье трава золотарника канадского.

5. Разработать методики определения суммы флаваноидов в спиртовом извлечении из сырья травы золотарника канадского, методику количественного определения подвергнуть валидации.

6. Провести исследование антиоксидантной и антибактериальной активности сырья травы золотарника канадского и извлечений на его основе.

7. Разработать проект фармакопейной статьи (ФС) «Золотарника канадского трава» на основе результатов фармакогностических исследований в соответствии с современными требованиями.

Научная новизна

Впервые обобщены и систематизированы морфолого-анатомические признаки стебля и цветки (ложноязычковые и трубчатые), листочков обертки соцветия травы золотарника канадского, дополнено описание признаков листьев. Описаны признаки цельного, измельченного сырья и порошка травы золотарника канадского, впервые описаны гистохимические реакции.

Установлен качественный и количественный состав флавоноидов и их гликозидов, органических и гидроксикоричных кислот в образцах, произрастающих в Московской и Ростовской областях. Усовершенствована методика количественного определения флавоноидов с применением спектрофотометрии и разработана методика количественного определения гидроксикоричных кислот методом спектрофотометрии.

Установлено содержание дубильных веществ, полисахаридов, минеральных веществ. Расширены данные о числовых показателях сырья травы золотарника канадского по сравнению с ранее действующей ФС.

Теоретическая и практическая значимость

Изучены микроскопические признаки листьев, стеблей, и цветков золотарника канадского, обоснованы значимые анатомо-диагностические признаки сырья, рекомендованные для включения в проект ФС.

Методики, предложенные для идентификации и количественной оценки флавоноидов в исходном сырье, использовались в дальнейшем при анализе показателей качества водных и водно-спиртовых извлечений из травы золотарника канадского.

На основании проведенных исследований разработан проект ФС «Золотарника канадского трава».

Предложены методики качественного и количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин и суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту в траве золотарника канадского в водно-спиртовом извлечении.

Методологии и методы исследования

Методология диссертационного исследования основана на информационном и аналитическом поиске данных зарубежных и отечественных литературных источников по фармакогностическому, фитотехнологическому, фармакологическому исследованию золотарника канадского, оценке изученности и актуальности темы, фитохимическом, анатомо-морфологическом, фармакологическом исследовании и исследовании стандартизации лекарственного растительного сырья и ЛС на его основе.

В работе использованы макро- и микроскопические, физические, физико-химические, химические, фармакологические и статистические методы анализа.

Связь задач исследования с планами научных работ

Диссертация выполнялась в соответствии с планом научно-исследовательских работ федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский

государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения России (Сеченовский Университет) (ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России) по проблеме «Новые знания и подходы в оценке качества и сертификации биологически активных соединений синтетического и природного происхождения, лекарственных препаратов, изделий медицинской техники (технологические и экологические аспекты)» (государственная регистрация № 01.2.011.68237).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Результаты морфолого-анатомического исследования цельного сырья, измельченного сырья и порошка травы золотарника канадского.
2. Результаты фитохимического изучения сырья травы золотарника канадского.
3. Результаты оптимизации методики количественного определения суммы флавоноидов в сырье с применением СФМ.
4. Методики качественного и количественного определения БАВ в водно-спиртовых извлечениях из травы золотарника канадского.

Степень достоверности

Достоверность полученных результатов обеспечена проведением требуемого количества экспериментальных исследований с применением комплекса методов (тонкослойная хроматография, высоко-эффективная жидкостная хроматография, УФ-спектрофотометрия, ЯМР ^1H -, ЯМР ^{13}C -спектроскопия, микроскопия).

Аналитические методики подвергнуты валидации в соответствии с современными требованиями ГФ РФ XIV издания с использованием программного обеспечения «Microsoft Excel 2016», «StatSuite» (iOS).

Апробация результатов исследования

Апробация данной работы была проведена на заседании межкафедральной научной конференции кафедры химии, кафедры фармацевтического естествознания, кафедры аналитической, физической и коллоидной химии Института Фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО

Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол № 7 от 25.12.20).

Основные результаты исследований доложены на: XXIV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство», Москва 2017; научно-практической конференции «Фармация: наука, образование, инновации и производство» (с международным участием), Ташкент, 2017; IV Международном научно-исследовательском конкурсе «Достижения вузовской науки», Пенза 2018; Международной научной конференции «Перспективы лекарственного растениеводства», Москва 2018.

Внедрение результатов исследования

Усовершенствованная методика определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин апробирована ООО «Векторфарм» и рекомендована для включения в менеджмент качества данного предприятия. Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтического естествознания ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (акт внедрения в учебный процесс ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России от 21.10.2020 г.).

Личный вклад автора

Автору работы принадлежит ведущая роль в выполнении экспериментальной части, а также ее интерпретации, анализе и обобщении полученных результатов. Вклад автора является первостепенным на всех этапах исследования: от информационно-аналитического поиска, постановки задач исследования, экспериментально-теоретической реализации задач до обсуждения полученных результатов в докладах и научных публикациях.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Публикации

По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, из них 7 – в профильных журналах, включенных в перечень ведущих периодических изданий ВАК РФ (5 из которых по направлению фармацевтические науки), 4 статьи опубликованы в журналах, входящих в международные базы данных (индексируемых в Web of Science, Scopus).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 169 страницах машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы (1 глава), экспериментальной части и обсуждения полученных результатов (главы 2, 3, 4, 5, 6), общих выводов, списка литературы и приложений. В диссертации содержится 47 таблиц, 31 рисунков, 7 приложений. Библиографический список состоит из 133 источников, из которых 81 отечественных и 52 иностранных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Этиология, патогенез и классификация воспалительных заболеваний пародонта

Среди воспалительных заболеваний полости рта особое место занимают заболевания пародонта (ЗП). Данные заболевания полости рта известны с древнейших времен. На сегодняшний день по данным ВОЗ воспалительные заболевания пародонта (ВЗП) являются наиболее распространенными. Известно, что в зависимости от региона процент распространенности ЗП составляет от 80 до 100% среди населения. При этом встречаемость ЗП у взрослого населения составляет 98%, а пациентов от 15 до 19 лет – 55-99 % [10,12,14,19,34,39,43,61].

Интенсивность и распространенность заболеваний пародонта в России увеличивается с каждым годом. Известно, 95 82% взрослого населения и 80% детей имеют признаки воспалительных заболеваний пародонта [10,40,60].

ВЗП могут образовывать глубокие пародонтальные карманы, вследствие которых происходит потеря зубов. Продолжительность лечения ЗП при тяжелых формах течения составляет достаточно долгий период - несколько лет, для некоторых пациентов продолжение лечения может занимать всю жизнь [10,15,34,39,43,60-62,126].

Таким образом, распространенность ВЗП является медицинской и социальной проблемой, которую нужно решать не только терапевтическими методами, но профилактической составляющей.

Этиология ВЗП включает 3 основных фактора:

- биопленка, являющаяся местом скопления пародонтальной флоры;
- ткани пародонта, как источники медиаторов воспаления;
- общие факторы, участвующие в метаболизме тканей полости рта, в том числе иммунный клеточный ответ [9,39,43].

Классификация ЗП (2001 г.):

1. Гингивит – воспаление десны, вызванное воздействием местных и общих факторов. Данное воспаление протекает без нарушения зубодесневого крепления и без проявления процессов деструкции в других отделах пародонта.
2. Пародонтит – воспаление пародонтальных тканей, которое характеризуется разрушением (деструкцией) связочного аппарата альвеолярной кости и периодонта.
3. Пародонтоз – это атрофически-дистрофический процесс, распространяющийся на все структуры пародонта, отличающийся отсутствием воспалительных процессов.
4. Синдромы, проявляющиеся в тканях пародонта (ранее идиопатические ЗП с прогрессирующим лизисом кости), т.е. это ЗП при синдромах Иценко-Кушинга, Папийон-Ле-февра, Шедиак-Хигаши, Элерс-Данлоса, Дауна, болезнях крови и др.
5. Пародонтомы – опухолеподобные процессы в пародонте (эпулис, эозинофильная гранулема, фиброматоз десен) [60,62].

Определяющим фактором в развитии пародонтита является биопленка. Биопленка (зубная бляшка) - бактериальный налет, являющийся определенной бактериальной экосистемой, которая обеспечивает жизнеспособность, а также сохранение ее микроорганизмов, увеличение их общей популяции. Биопленка рассматривается как единое существо, а не как сосуществование различных штаммов бактерий [9,10,44,49,60,62,89,96]. Некоторые бактерии, входящие в состав биопленки, являются наиболее агрессивными и могут проникать в ткани пародонта: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Prevotella intermedia*, *Porphyromonas gingivalis*. Данные бактерии участвуют во внедрении в ткани пародонта, тем самым вызывая иммунный ответ, что в свою очередь развивает аутоиммунное воспаление или иммунодефицитное состояние [34,43,60,62,96-98,100].

Установлено, что при дефиците антиоксидантов, ЗП протекают тяжелее. Выявлена зависимость патоморфологических изменений пародонта с увеличением процессов перекисного окисления липидов. Поэтому при ЗП обосновано использование антиоксидантов обосновано с патогенетической точки зрения. При это антиоксиданты играют роль противовоспалительных агентов, ингибиторов свободнорадикального окисления, а также улучшения репаративных процессов [60,62,95,104,106,108].

1.2. Фитопрепараты, используемые в стоматологии для профилактики и лечения воспалительных заболеваний пародонта

Для лечения и профилактики заболеваний пародонта используется как синтетические препараты, так и препараты растительного происхождения. Однако в последнее время часто наблюдаются различные аллергические реакции в ответ на синтетические препараты [35,53]. При этом причиной аллергических реакций становятся не только действующие вещества, но и наполнители лекарственных препаратов [13]. Поэтому для профилактики и поддержания лечения предпочтение, на наш взгляд, следует отдавать фитопрепаратам.

Известно, что препараты растительного происхождения обладают более мягким действием, практически не имеют побочных эффектов [35]. Среди растительного сырья при производстве фитопрепаратов для профилактики и лечения заболеваний пародонта используются ревень, женьшень, мята, ромашка, солодка, календула, фенхель, сельдерей, черемуха Грея, мирр, шалфей, эхинацея, мальва, боярышник, тимьян, пихтовая живица, анис, гвоздика, можжевельник, зверобой, эвкалипт, аир, тысячелистник, шиповник, корица [1,2,13,14,36,44,63,80,81]. В стоматологической практике для лечения различных заболеваний полости рта используются как хирургические методы, так и лекарственная терапия [14]. В качестве лекарственной формы используются ополаскиватели, бальзамы, гели, а также пленки [1,2,13,14,23,36,44,62,80,81].

В таблице 1 приведены препараты, которые используются для лечения и профилактики воспалительных заболеваний пародонта.

Таблица 1. Фитопрепараты, используемые для лечения и профилактики воспалительных заболеваний пародонта

Наименование препарата	Растительное сырье в составе препарата	Форма выпуска	Страна-производитель
Тополин	Почки тополя бальзамического	10% спиртовой раствор	Россия
Тополин с экстрактом ромашки	Почки тополя бальзамического, цветки ромашки	Мазь 5%, гель 5%	Россия
Ромазулан	Цветки ромашки аптечной	Концентрат для приготовления раствора для приема внутрь, наружного или местного применения	Румыния
Стоматофит	Корневища айра, трава арники, кора дуба, листья мяты перечной, цветки ромашки аптечной, трава тимьяна обыкновенного, листья шалфея лекарственного	Экстракт жидкий	Польша
Масло шиповника	Плоды шиповника Репарации тканей стимулятор растительного происхождения.	Масло для приема внутрь, местного и наружного применения	Россия
Масло облепихи	плодов облепихи крушиновидной Препарат, активизирующий обмен веществ в тканях,	Масло для приема внутрь и наружного применения	Россия

	улучшающий трофику и стимулирующий процесс регенерации Фармако-терапевтическая группа: Репарации тканей стимулятор растительного происхождения		
Экстракт алоэ жидкий	Листья алоэ древовидного	В ампулах по 1 мл для инъекций в переходную складку полости рта (для стимуляции процесса регенерации при заболеваниях пародонта) и подкожно	Россия
Каротолин	Плоды шиповника	Масляный экстракт, флакон 100 мл	Украина
Настойка календулы	Цветки календулы лекарственной	Настойка, 40 мл	Россия
Настойка эвкалипта	Листья эвкалипта прутовидного	Настойка, 25 мл	Россия
Ротокан	Цветки календулы лекарственной, цветки ромашки аптечной, трава тысячелистника обыкновенного	Экстракт, 25, 50 и 100 мл	Россия
Стомафлор	Плоды облепихи (концентрат масла)	Мазь для местного применения	Россия
Сангвиритрин	трава маклейи сердцевидной и маклейи мелкоплодной	Спиртовой раствор 0,2% 50 мл, линимент 0,5% в банках и тубах 10 и 20 г	Россия

Хлорофиллипт	Листья эвкалипта	Раствор для приема внутрь, местного и наружного применения спиртовой 1% 100 мл, раствор для местного применения (масляный) 2%, 20 мл и 30 мл	Россия, Украина
Мараславин	Трава полыни понтийской, трава чабера, бутоны гвоздичного дерева, плоды перца черного, корневища имбиря	Раствор для местного применения 1%	Болгария
Дентинокс	Цветки ромашки аптечной	Во флаконах-капельницах по 10 мл (раствор) или в тубах по 10 г (гель)	Германия
Камистад	Цветки ромашки аптечной	Гель для местного применения	Германия
Пластина-ЦМ	Трава зверобоя, трава шалфея, трава тысячелистника	Пластины	Россия
Фармодонт	Макклея, шалфей, шиповник, ромашка	Пластины стоматологические	Украина
Фармадонт 2	Ромашка, валериана, арника, мята	Пластины	Украина
Фитодент	Корневища аира, плоды софоры японской, цветки ноготков, травы чистотела, листьев крапивы, цветки ромашки, плоды шиповника	Настойка для местного применения 100 мл	Украина

Продолжение таблицы 1

Пародиум	Экстракт ревеня	Гель 50 мл	Франция
Сальвин	Листья шалфея лекарственного	1 % спиртовой раствор 10 мл	Россия, Украина
Артродонт	Корни солодки	Паста 1% 8 г	Франция
Сок каланхоэ	Побеги каланхоэ (анальгетики и противовоспалительное)	Раствор для местного и наружного применения спиртовой 20 мл	Россия
Галеновые препараты на основе черемухи Грея (К.Б. Кутурбаев и соавт.)	Черемуха Грея	Галеновые препараты	-
Траумель С	Календула лекарственная, гамамелис виргинский, тысячелистник обыкновенный, красавка обыкновенная, аконит синий, ромашка аптечная, окопник лекарственный, маргаритка многолетняя, эхинацея пурпурная, зверобой продырявленный	Мазь 50 и 100 г, таблетки 50, капли 30 мл, растворы для инъекций в ампулах	Германия

В таблице 1 [3,71] представлены результаты анализа литературных источников, из которых следует, что наиболее популярным растительным сырьем при производстве стоматологических фитопрепаратов является ромашка аптечная (12,1 %). Также в составах часто встречается шалфей (7,5 %), календула, шиповник, мята (по 6,1%). На сегодняшний день ведется по-

иск наиболее оптимального растительного сырья для введения в препараты для профилактики и лечения заболеваний пародонта. Это следует из данных таблицы: используются более 37 наименований растений.

Фармакологическое действие используемых лекарственных растений достаточно широкое: антибактериальное (ромашка аптечная, календула, арника), анальгетическое (каланхоэ), активизирующее обмен веществ в тканях, улучшающее трофику и стимулирующий процесс регенерации и репарации тканей стимулятор растительного происхождения (шиповник, облепиха), противовоспалительное (шалфей, эвкалипт) [51,63,113].

В качестве лекарственной формы в стоматологической практике используются спиртовые и масляные растворы, мази, гели, концентраты, экстракты, настойки, линименты, пасты и пластины [1,14,23,36,44,63,80,81].

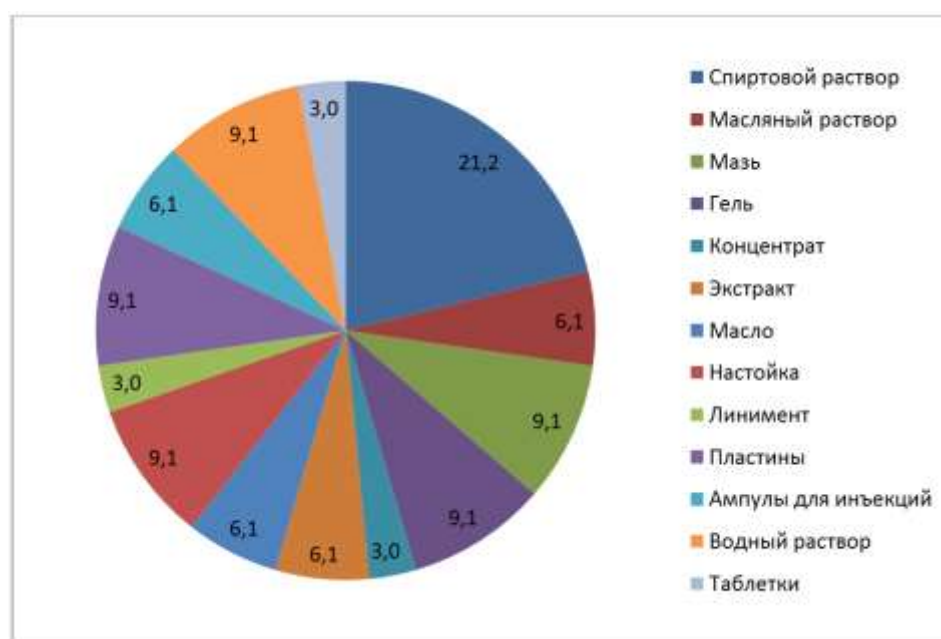


Рисунок 1. Диаграмма лекарственных форм препаратов, применяемых для лечения и профилактики заболеваний пародонта.

Известно, что в патогенезе воспалительных заболеваний пародонта участвуют бактерии, образующие бляшки [12,62]. Основным механизмом образования бляшек является перекисное окисление липидов [12,62]. При этом происходит образование свободных радикалов, что в дальнейшем

приводит к различным воспалительным заболеваниям десен [62]. В системе организма присутствует антиоксидантная система защиты, которая защищает ткани от ПОЛ. Но собственных сил организма в борьбе с ПОЛ бывает недостаточно [62]. На степень АОЗ организма влияет наследственные факторы, психоэмоциональный стресс [62]. Поэтому на стадии профилактики, а также лечения стоит уделять особое внимание данной защите организма путем использования препаратов, обладающих антиоксидантной активностью.

Род золотарник (*Solidago*) широко распространен по всему миру. Среди групп биологически активных веществ, входящих в состав золотарника, флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, сапонины, органические кислоты, эфирные масла. Богатый химический состав представителей золотарника делает его привлекательным для применения в медицине в качестве лекарственного растительного сырья. Известно, что золотарник обыкновенный и золотарник канадский входят в Европейскую и Британскую фармакопеи [87,101]. В последнее время были изучены виды Золотарник кавказский и Золотарник даурский. Золотарник канадский (*Solidago canadensis* L. сем. *Asteraceae*) применяется в народной медицине различных стран в течение столетий [8,74,76,114], а также входит в число фармакопейных статей Европы [87,101] и России [75], содержит различные группы биологически активных веществ [76,77]. Золотарник канадский входит в состав некоторых растительных препаратов (Марелин, Урофлукс, Фитолизин и др.), обладающих противовоспалительным действием [52,80,81]. На сегодняшний день доказана антиоксидантная и антибактериальная активность золотарника канадского [83,112,115,123.125,131,132], что позволяет сделать вывод о перспективности использования данного лекарственного растительного сырья для профилактики и лечения пародонтоза в комплексной терапии и включение настойки золотарника в разрабатываемые ЛФ для использования в стоматологии. Однако, на сегодняшний день фармакопейная статья на траву

золотарника канадского не соответствует требованиям Государственной Фармакопеи XIV издания. Поэтому, актуально провести детальное фармакогностическое исследование данного сырья.

1.3. Ботаническая характеристика, химический состав и применение золотарника канадского

Золотарник канадский (*Solidago canadensis* L.) относится к широко известному роду золотарник (*Solidago* L.). Род золотарник насчитывает около 80 видов. Растения рода золотарник широко распространены в северном полушарии: Северная Америка, Канада, Европа, Западная и Восточная Сибирь, Дальний Восток, Кавказ, Китай, Тайвань [75,78,82,88].

В странах бывшего СССР обнаружены 26 видов этого рода. Для культивирования используются около 20 видов. Так как сведений о химическом составе, а также фармакологической активности рода золотарник недостаточно в научной медицине мира используются всего несколько растений. Некоторые виды рода золотарник являются фармакопейными растениями (*Solidago canadensis*, *Solidago virgaurea*, *Solidago gigantea*, *Solidago chilensis*). На территории Украины впервые был культивирован золотарник канадский в 1986 году для производства препарата Марелин [76,78,82,99,101,115].

Золотарник канадский растет в основном на лугах и пастбищах, вдоль дорог, канав, нагорья леса, саванны, известняковые поляны и т. д. По некоторым данным *S. canadensis* - очень агрессивное растение и может уменьшить разнообразие видов или локально конкурировать со всеми местными растениями. Однако также известно, что золотарник канадский внедряется только уже в нарушенные фитоценозы не нарушая устойчивые. Успех его вторжения обусловлен аллелопатическими соединениями, которые он может освободить [48,56]. Аллелопатические соединения также подавляют местные патогены почв [56]. Было обнаружено, что экстракты

ацетона *S. canadensis* показали аллелопатические эффекты на рост других сорняков [48,56].

Использование травы золотарника в народной медицине встречается в этносах следующих регионов: Кавказ, Сибирь, Республика Коми, Китай, Молдова, Белоруссия. При этом сфера использования настоев и отваров травы золотарника не ограничивается одной нозологией. Известно применение травы золотарника в качестве противовоспалительного, антисептического, диуретического, потогонного, отхаркивающего, гемостатического средства. Используется для лечения заболеваний мочеполовой системы, холецистита, желчнокаменной болезни, острых респираторных инфекциях, экземе, асците, коклюше, подагре, артритах, сахарном диабете. Появились данные о противокашлевом эффекте травы золотарника канадского [61,66,75,76].

Историческая справка. Растение золотарник впервые описано в Библии. На Ближнем Востоке полагали, что золотарник является посохом или жезлом Аарона [76].

В русском языке название золотарник происходит от слова «золото». Это объясняется цветом цветков золотарника, которые являются золотисто-желтыми. В русском языке также встречается название золотая розга, которое дано по характерной форме стебля и соцветия. При этом название золотая розга при переводе встречается в английском и французском языках (*goldenrod* и *verged'or*, соответственно) [76].

В словаре Анненкова приводится около 50 синонимов растения золотарник, что объясняется тем, что в каждой российской губернии золотарник называли по-своему (например, блошник, живительная трава, винокур, звербой, василек малый, золотое перо, живительная трава, золотая розга, золототысячная трава, золотуха, желтый цвет, золотушник, краснянка, порышник, семисильник, цвинчарей, цвинчурия, центурия, золотая раневая трава, костовяз, боровой пуховик, грабки, желтушник, мать хлеба, полетуша, смертельник) [76].

Растения рода золотарник происходят родом из Америки (Бразилия, Чили, Канада, Мексика и США), но распространение видов на данный момент занимает более широкий ареал (Европа, Россия) [76-78,83].

Морфологическая характеристика, ареал распространения. Золотарник канадский (*Solidago canadensis* L.) – многолетнее травянистое растение рода золотарник (*Solidago*) семейства астровые (*Asteraceae*) высотой около 1 м. Нижние листья являются черешковыми, верхние – сидячие. Все листья простые, с пильчатым краем. Цветки мелкие, желтые, собраны в многочисленные мелкие корзинки. Корзинки в свою очередь собраны в метельчатые соцветия. Плод семянка [76,78].

Родиной золотарника является Америка (США, Канада, восточная Мексика). В данных регионах встречается около 100 видов рода золотарник. В Европе золотарник используется в качестве декоративного растения, т.к. является неприхотливым, морозо- и засухоустойчивым и имеет тонкий аромат [76].



Рисунок 2. Золотарник канадский (*Solidago canadensis* L.)

1.4. Химический состав золотарника канадского

Представители рода *Solidago* известны содержанием различных групп БАВ и являются перспективными лекарственными растениями. Известно, что род золотарник богат полифенольными соединениями (флавоноиды,

фенолокислоты), тритерпеновыми сапонинами, органическими кислотами, эфирным маслом, дубильными веществами, фитоэкдизонами, а также полисахаридами в свободном виде и связанные с белками [75-77,83,85,99].

Отечественная и зарубежная литература содержит данные об изучении состава групп БАВ золотарника канадского. В траве обнаружены флавоноиды (кемпферол, кверцетин, рутин, изорамнетин), фенолокислоты, полисахариды, сапонины, дубильные вещества [32,76,83,85].

Solidago canadensis L. по сравнению с другими представителями рода *Solidago* содержит значительное количество флавоноидов. Также содержит дубильные вещества, гидроксикоричные кислоты и кумарины [76,83,85].

Отмечается широкий спектр применения рода *Solidago* в составе ЛС при заболеваниях различных систем органов (рисунок 3) [20,22,24-32,49,76]

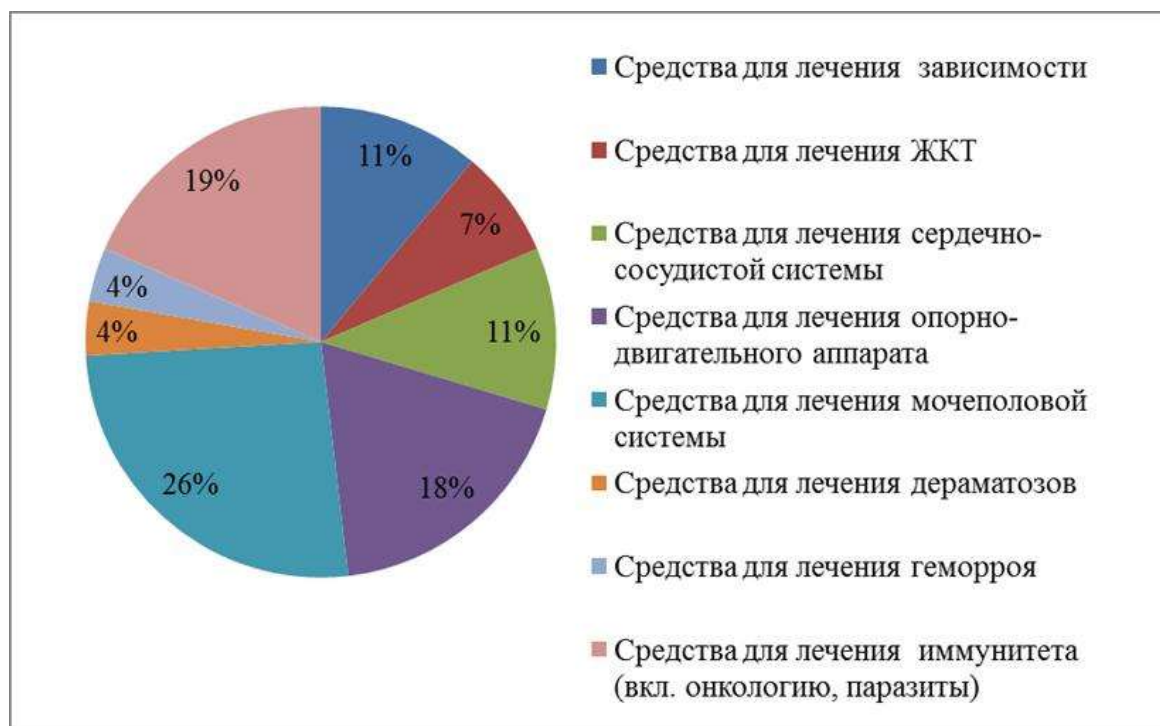


Рисунок 3. Группы ЛС, содержащие золотарник

В таблице 2 перечислены вещества, обнаруженные в *Solidago canadensis* L. в различных частях растения.

Таблица 2 - БАВ, содержащиеся в золотарнике канадском

Наименование группы БАВ	Выделенные соединения	Источник литературы
Флавоноиды	Рутин, кемпферол, изорамнетин, астрагалин, изорамнетин-3-О-рутинозид, кемпферол-3-О-глюкорамнозид, кверцетин-3-О-глюкопиранозид, кверцетин-3-О-(6 ¹¹ -О_ацетил)-глюкопиранозид, изорамнетин-3-О-глюкопиранозид, рамнетин-3-О-глюкорамнозид, изорамнетин-3-О-(6 ¹¹ -О-ацетил)-глюкопиранозид, никотифлорин (кемпферол-3-О-α-L-рутинозид), гиперозид, изокверцетрин (кверцитин-3-О-β-D-глюкозид), афзелин (кемпферол-3-О-α-L-рамнозид), кверцитрин (кверцитин-3-О-β-D-рамнозид)	4,15,74,77,97,130
Органические кислоты	Аскорбиновая, лимонная, щавелевая, яблочная (маликовая), янтарная, виннокаменная, галловая, фумаровая кислоты	76,133
Гидроксикоричные кислоты	Хлорогеновая, кофейная, цикориевая, феруловая, хинная кислоты	76,77,116
Тритерпеновые сапонины	Гликозиды олеаноловой кислоты, канаденсисапонины, байогенинсапонины, 3β-(3R-ацетоксигексадеканоилоксид)-люп-20(29)-ен, 3β-(3-кетогексадеканойл-оксид)-люп-20(29)-ен, 3β-(3R-ацетоксигексадеканоилоксид)-29-нор-люпан-20-он, 3β-(3-гетогексадеканоилоксид)-29-нор-люпан-20-он,	76,77,130
Эфирное масло	α-бисаболен, борнилацетат, гермакрен В, гермакрен D, δ-кадиен, камфен, карвакрол, α-копаен, 3-эпи-α-кубебен, 3-эпи-β-кубебен, β-мирцен, муурола-4,10(14)-диен-1-β-ол, лимонен, α-пинен, сабинен, терпенолен,	123

	β-пинен, микрен, p-цимен, (E)-оцимен, терпенолен, транс карвеол, метиловый - эфир тимола, метиловый эфир карвакрол, тимол, α-иланген, изоледен, α-транс-бергамотен, γ-мууролен, γ-куркумен, α-зингиберен, δ-кадинен, (E)-неролидол, β-копаен-4-α-ол, кубебан-11-ол, жуненол, кубенол, 1,8-цинеол, β-цедрен-9-он, еремолигенол, , эпи-α-кадинол, α-муурол, мууролен(14гидрокси-α) β-элемен, δ-элемен,	123
Дубильные вещества	Танин, катехин	15,64,72,76,77,120

На данный момент в состав зарегистрированных лекарственных препаратов входит трава золотарника канадского, хотя имеются данные и об исследования состава корня золотарника канадского.

1.4. Применение золотарника канадского в народной и научной медицине

Золотарник канадский применяется последние 700 лет в Европе в качестве противовоспалительного средства при заболеваниях мочевыводящих путей [85]. В народной медицине золотарник используется на Кавказе, в Сибири, в Юго-Восточной Азии, в Республике Молдова и Республике Беларусь как противовоспалительное антибактериальное средство. В данных регионах золотарник канадский применяется в виде отваров и настоев. Среди нозологий применения золотарника заболевания мочеполовой системы (почек, мочевого пузыря, предстательной железы), заболевания респираторных органов, желчнокаменная болезнь. [76,85,110].

Известно, что сырье травы золотарника канадского входит в Европейскую [101] и Британскую [88] фармакопею, однако отсутствует в Российской фармакопее XIV издания [16,17].

Таблица 3 - Сравнение показателей описанный в ЕФ и БФ с ФС -42-2777-91

Показатель	Европейская (8.0) и Британская (2009) фармакопеи	ФС-42-2777-91
Определение	Цельные или разрезанные, высушенные, цветущие воздушные части <i>Solidago gigantea</i> Ait или <i>Solidago canadensis</i> L., их разновидности или гибриды и / или их смесей.	Собранная в начале цветения, высушенная и освобожденная от грубых стеблей, трава культивируемого многолетнего травянистого растения золотарника канадского – <i>Solidago canadensis</i> L., сем. астровых - <i>Asteraceae</i> .
Описание	Стебли зеленовато-желтые или зеленовато-коричневые, частично тонированные красноватые, округлые, более или менее заметные рифленые, голые и гладкие в нижней части, слегка или густо опушенные в верхней части. Они твердые с беловатым корнем. Листья зеленые, сидячие, ланцетные, с зазубренным краем, длиной 8-12 см и шириной около 1-3 см, верхняя поверхность зеленая и более или менее голая, нижняя поверхность серо-зеленая и опушенная, особенно на жилках. Соцветие состоит из нескольких односторонних изогнутых кистей, которые вместе образуют пирамидальную метелку в конце стеблей. Каждая корзинка имеет обертку, состоящую из линейно-ланцетных, небритых желтовато-зеленых прицветников, окружающих один ряд желтых ложноязычковых цветков примерно такой же длины, как и обертка; желтые, радиально расположенные трубчатые цветки длиннее, чем ложноязычковые цветочки; коричневатая завязь с белым пятном шелковистых волосков.	Смесь измельченных листьев, верхушек, цветущих побегов и отдельных осыпавшихся соцветий, цветков, недоразвитых плодов и их хохолков. Стебли округлые, мягко оттопыренные, опушенные. Листья с тремя продольными, выступающими снизу жилками, ланцетные или линейно-ланцетные, длинно заостренные на верхушке, по краю остропильчато-зубчатые или цельнокрайние, коротко реснитчатые, со слегка завернутым краем, снизу и сверху коротко волосистые по всей поверхности или только по жилкам. Корзинки многочисленные, мелкие до 4 мм в диаметре, в однобоких дугообразно изогнутых кистях, собранных в широкую метелку. Обертка из 2-3 рядов линейно-ланцетных, туповатых, бледно-зеленых листочков, до 2 мм длины. Все цветки обоеполые, краевые - язычковые, почти одинаковой длины со средними трубчатыми цветками и едва длиннее обертки. Плод – узкая, цилиндрической формы семянка с хохолком из тонких белых волосков. Цвет стеблей от светло-зеленого до бурого, местами фиолетовый; листьев – зеленый или светло-зеленый, цветков – желтый. Запах отсутствует. Вкус горьковатый, слабо вяжущий.

Микроскопия	<p><i>Микроскопия порошка.</i> Порошок серовато-зеленый. В порошке обнаруживаются многоклеточные волоски и их фрагменты, трихомы, состоящие из удлинённых клеток с заостренной верхней клеткой, свободными от поверхности и образующих заостренные выступы по всей длине; фрагменты листового мезофилла с сосудистыми пучками, сопровождающиеся секреторными клетками; фрагменты листового эпидермиса с извилистыми волнообразными клетками и устьицами аномоцитного типа; однорядные до 5 или 6 клеток эпидермиса окружают трихомы. Трихомы некоторые кнутообразные с более толстостенной концевой клеткой; фрагменты листочка обертки с длинными прямыми сосочками; фрагменты стебля с сетчатыми и спиральными сосудами; пыльцевые зерна, с 3 зародышевыми порами, шиповатые снаружи; обнаруживаются многочисленные изогнутые формы волосков</p>	<p>При рассмотрении препарата листа с поверхности отмечено: клетки эпидермиса верхней стороны имеют многоугольную форму и прямые стенки, контуры клеток нижнего эпидермиса слабо извилистые; над жидкими клетки эпидермиса вытянутой формы с продольными складками кутикулы. Устьица и волоски на обеих сторонах листа. Устьица окружены 3-6 клетками эпидермиса (аномоцитный тип). Волоски простые, двух типов: крупные 4-клеточные, с толстой оболочкой и складчатой кутикулой, с заостренной конечной клеткой, заметно расширяющихся к основанию и часто коленчато изогнутые; и мелкие двухклеточные волоски, конечная клетка которых несколько вздута и имеет тонкий нитевидный вырост. У основания волосков клетки эпидермиса часто образуют розетку</p>
Качественные реакции	<p><i>Исследуемый раствор.</i> Экстрагент: метанол (кипятят на водяной бане с обратным холодильником) Время экстрагирования: 10 мин. Охлаждают и фильтруют. <i>Растворы стандартов.</i> Раствор массой 1,0 мг хлорогеновой кислоты, 2,5 мг кверцитрина и 2,5 мг рутина в 10 мл метанола. Пластина (НФ): ТСХ-пластина с силикагелем. ПФ: безводная муравьиная кислота, вода, метилэтилкетон, этилацетат (6: 6: 18: 30) по объему.</p>	<p>15 мл раствора А (см. раздел «Количественное определение») помещают в выпарительную чашку и упаривают досуха на кипящей водяной бане. Остаток растворяют в 3 мл 95% спирта, прибавляют 0,5 мл г порошка магния или магниевой стружки; постепенно раствор окрашивается в красный цвет (флавоноиды).</p>

	<p><i>Обнаружение</i> 20 мкл испытуемого раствора и 10 мкл эталонных растворов наносят на старт в виде полосок.</p> <p><i>Расстояние:</i> 10 см. <i>Сушка:</i> при 100-105 °С. <i>Обнаружение:</i> распыление 10 г / л раствора аминоэтилового эфира дифенилборной кислоты в метаноле и затем 50 г/л раствора макроглола 400 в метаноле. Дать постоять в течение 30 мин. Осмотрите в ультрафиолетовом свете при 365 нм.</p> <p><i>Результаты:</i> последовательность зон, присутствующих на хроматограммах, полученных с эталонным раствором и тестовым раствором: 1- Раствор рутина: оранжевая флуоресцентная зона. Слабая интенсивная желтовато-бурая флуоресцентная зона (рутин), 2-Раствор хлорогеновой кислоты: светло-голубая флуоресцентная зона Светло-голубая зона и / или желтая флуоресцентная зона (хлорогеновая кислота), 3- раствор кверцитрина - желтовато-бурая флуоресцентная зона. Слабая и интенсивная желтовато-коричневая флуоресцентная зона (кверцитрин). Кроме того, в хроматограмме, могут присутствовать и другие зоны.</p>	
Числовые показатели	<p>Посторонние вещества: не более 5 % коричневатых частей и не более 2 % других посторонних веществ.</p> <p>Влажность: не более 10%, определяемые на 0,500 г порошкообразного препарата путем сушки в сушильном шкафу при 105 °С в течение 2 ч.</p> <p>Зола общая - не более 7,0%. Зола, нерастворимая в соляной кислоте: не более 1,0%.</p>	<p>Количественное определение: сумма флавоноидов в пересчете на рутин не менее 3,0%; влажность не более 12,0% золы общей не более 11,0 %; стеблей не более 15,0 %; пожелтевших и побуревших листьев не более 10,0 % органической примеси не более 3,0 %; минеральной примеси не более 1,5 %.</p>

Количественное определение	<p>В круглодонную колбу $V = 100$ мл ввести $0,200$ г порошкообразного лекарственного средства, добавить гексаметилентетрамин $V = 1$ мл концентрацией 5 г/л раствора, ацетон $V = 20$ мл и соляную кислоту $V = 2$ мл. Кипятить смесь с обратным холодильником в течение 30 мин. Фильтровать жидкость через маленький фильтр из абсорбирующего хлопка в колбу на 100 мл. Ввести абсорбирующий хлопок к остатку в круглодонную колбу, экстракт 20 мл смешать с 20 мл ацетона, кипятить под обратным холодильником в течение 10 мин (далее повторить). Дайте остыть. Отфильтровать комбинированные экстракты ацетона через фильтровальную бумагу в мерную колбу. Промыть колбу и фильтровальную бумагу и разбавить до $100,0$ мл ацетоном. Ввести $20,0$ мл раствора в делительную воронку, ввести 20 мл воды и встряхнуть смесь. 1 часть смеси смешать с 15 мл этилацетата. Остальные 3 части по отдельности каждый смешать с 10 мл этилацетата. Объединить этилацетатные экстракты в делительную воронку, дважды промыть 50 мл воды и фильтровать экстракты через безводный сульфат натрия массой 10 г в мерную колбу. Разбавить до $50,0$ мл этилацетатом, промыть делительную воронку и сульфат натрия.</p> <p>Испытание. К $10,0$ мл исходного раствора добавить $1,0$ мл раствора хлорида алюминия и разбавить до $25,0$ мл 5% -ным раствором ледяной уксусной кислоты в метаноле.</p>	<p>ГСО рутина массой $0,1$ г (точная навеска) предварительно высушенного при температуре от 130 до 140 °С до постоянной массы, помещают в мерную колбу $V = 100$ мл, растворяют в $V = 70$ мл метилового спирта при нагревании на водяной бане, охлаждают, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают. $0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 1,0; 1,5; 2,0$ м полученного раствора помещают в мерные колбы $V = 50$ мл, доводят объемы растворов раствором алюминия хлорида ($0,05$ моль/л) до метки и перемешивают. После 20 минут измеряют оптическую плотность при длине волны 400 нм, в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор $AlCl_3$ ($0,05$ моль/л).</p> <p>Для построения калибровочного графика на оси ординат откладывают величину оптической плотности, а на оси абсцисс – концентрацию в 1 мл раствора, выраженную в граммах.</p>
----------------------------	---	---



	<p>Раствор сравнения. Разбавить 10,0 мл исходного раствора до 25,0 мл с 5% -ным раствором ледяной уксусной кислоты в метаноле.</p> <p>Измерить поглощение испытуемого раствора при 425 нм через 30 мин по сравнению с раствором сравнения.</p> <p>Рассчитывать процентное содержание суммы флавоноидов, в пересчете на гиперозид, из выражения: (принимая значение удельной абсорбции гиперозида 500) $A = \text{поглощение}$, измеренное при 425 нм,</p> $m = \text{масса исследуемого препарата, в граммах. } \frac{A \cdot 1,25}{m}$	
Упаковка	Отсутствует	По ГОСТ 6077-80. В тюки из ткани по ГОСТ 19298-73 не более 50 кг нетто или в мешки по ГОСТ 18225-72 или ГОСТ 19317-73 не более 15 кг нетто.
Маркировка	Отсутствует	По ГОСТ 6077-80 и ГОСТ 14192-77
Транспортирование	Отсутствует	По ГОСТ 6077-80
Хранение	Отсутствует	По ГОСТ 6077-80
Срок годности	Отсутствует	5 лет
Применение	Отсутствует	Сырье для получения сухого экстракта


В качестве сырья золотарника канадского заготавливается трава [88,101].

Присутствие многообразия различных групп БАВ в золотарнике обуславливает его фармакологические эффекты, например, спазмолитический, противовоспалительный, диуретический [76,131].

На сегодняшний день на фармацевтическом рынке встречаются препараты отечественного и зарубежного производства, включающие в свой состав траву золотарника канадского: Марелин (Россия), Простанорм (Россия), Цистиум солидаго (Германия), Урофлукс (Германия, Франция), Фитолизин (Польша) [22,32,36,54,66,76].

Таблица 4 - Лекарственные средства на основе *S. canadensis* L.

Наименование лекарственного препарата	Лекарственная форма	Фармакологическое действие	Показания	Страна-изготовитель
Марелин	Таблетки, покрытые пленочной оболочкой	Спазмалитическое, диуретическое, противовоспалительное, действие, способствует отхождению мочевых конкрементов, уменьшает боли при почечной колике, сдвигает рН в кислую сторону при щелочной реакции мочи	Фосфатный и оксалатный нефроуролитиаз, почечная колика	Россия
Простанорм 	Жидкий экстракт для приема внутрь; таблетки, покрытые оболочкой	Простатотропное (обусловленное противовоспалительной активностью); диуретическое	В комплексной терапии хронического неспецифического простатита	Россия
Цистиум солидаго раствор 	Раствор	Диуретическое, противовоспалительное, спазмолитическое	Воспалительные заболевания мочевыводящих путей, нефроуролитиаз (профилактика и лечение).	Германия
Урофлукс	Порошок	Диуретическое, противовоспалительное	Инфекционные заболевания мочевыводящих путей – пиелит, цистит, уретрит	Германия, Франция

Фитолизин 	Паста для приготовления суспензии для приема внутрь	Противовоспалительное, диуретическое, спазмолитическое, противомикробное.	Нефроуролитиаз, предупреждение кристаллизации солей в моче, инфекции мочевыводящих путей.	Польша
--	---	---	---	--------

1.6. Перспективность создания отечественных препаратов на основе золотарника канадского для профилактики и лечения воспалительных заболеваний пародонта

На наш взгляд среди выбора ЛРС для лечения и профилактики воспалительных заболеваний пародонта возможно применение золотарника канадского. Данное ЛРС проявляет антибактериальный и антиоксидантный эффекты, влияя на этиологическое патогенетическое факторы развития заболеваний полости рта.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Выполнен анализ литературных источников (отечественных и литературных) для оценки характеристики изученности химического состава, фармакологического действия золотарника канадского. Установлено, что *Solidago canadensis* L. имеет широкое распространение, содержит комплекс веществ различных групп БАС, широко используется в народной и научной медицине.

2. Отмечено применение препаратов на основе надземных органов золотарника канадского в качестве антибактериального, противовоспалительного, антиоксидантного средства.

3. Действующая статья на траву золотарника канадского не соответствует стандартам качества на ЛРС. Актуальным представляется глубокое фармакогностическое исследование *S. canadensis* L. по современным требованиям с целью создания ФС, соответствующей стандартам качества по ЛРС – трава золотарника канадского по показателям микроскопия, радионуклиды, тяжелые металлы, количественное определение. Данное исследование необходимо для создания отечественных лекарственных препаратов растительного происхождения на основе данного сырья.

4. Необходимо также углубленное фитохимическое изучение БАВ сырья травы золотарника канадского, водных и спирто-водных извлечений на его основе, изучение влияния факторов на выход определенных БАВ, получение рациональной лекарственной формы, разработка методик качественного и количественного анализа.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования, их характеристика

В качестве объекта исследования использовалась трава золотарника канадского (*S. canadensis* L.), заготовленную в период 2016-2018 гг., собранную в Тульской, Московской, Тверской областях Российской Федерации в период бутонизации. Сушка сырья проводилась воздушно-теневым способом [16,17].

Образцы сырья хранились в бумажных мешках в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0011.15 «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» ГФ РФ XIV издания [17] в сухом, прохладном, хорошо проветриваемом помещении, вдали от прямых солнечных лучей. Качество сырья соответствовало требованиям ФС 42-2777-91 «*Herba Solidaginis canadensis* – Трава золотарника канадского» [82].

В процессе исследования использовались водные и спирто-водные извлечения, настои из травы золотарника канадского, приготовленные по ГФ РФ XIV издания [17].

Стандартными образцами являлись коммерчески доступные соответствующие индивидуальные вещества фирмы «Sigma-Aldrich» и «Fluka».

2.2. Макроскопический и микроскопический анализ

При макроскопическом изучении использовалось указанное сухое лекарственное растительное сырье по методике ГФ РФ XIV ОФС.1.5.1.0002.15 «Травы» [17]. Микропрепараты для идентификации признаков готовили по методике ОФС «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» ГФ РФ XIV издания [17].

Изучение микропрепаратов проводили с помощью микроскопов (увеличение x40, x200, x400) Olympus CH30, Olympus Optical Co., LTD., Japan. Результаты фиксировали в виде фотографий.

2.3. Идентификация ЛРС и его фитохимический анализ

2.3.1. Профиль ЯМР-спектроскопии ЛРС

Перспективность внедрения в повседневную медицинскую практику лекарственных средств, содержащих в качестве активного начала комплекс биологически активных веществ золотарника, показана в многочисленных исследованиях [76]. В этой связи актуальна разработка методик идентификации и оценки качества используемого сырья золотарника. Как известно [46,57], для идентификации растительного сырья и препаратов на его основе в целом ряде стран рекомендован метод спектроскопического «фингерпринта». Это связано с тем, что состав растительного сырья характеризуется большим разнообразием химически разнородных соединений в широком концентрационном диапазоне. Вследствие этого характеристический спектр любого растительного объекта является сугубо индивидуальным и может в качестве эталона служить надёжной основой для идентификации сырья и оценки его качества.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), являясь современным аналитическим методом, по информативности, экспрессности, достоверности в полной мере отвечает требованиям действующей Фармакопеи [17]. Общеизвестно, что ЯМР-спектроскопия является ценным и беспристрастным аналитическим методом, что подтверждено многочисленными экспериментальными данными [7,11], полученными при анализе многокомпонентных сложных смесей (растительных экстрактов, лекарственных препаратов, биологических жидкостей, экстрактов тканей организма и т.п.). Фармакопея допускает при установлении подлинности смеси веществ (в нашем случае водных и спирто-водных извлечений) [17] использование одномерных спектров ЯМР целиком, как «отпечатков пальцев» объекта. В данном случае детализация значений химических сдвигов δ и мультиплетности отдельных сигналов не требуется.

Органический состав растительных экстрактов, как правило, очень сложен, велико общее содержание протонов, что делает ^1H ЯМР-спектры

объектов данного рода трудно разрешимыми. Поэтому спектроскопия ЯМР углерода-13 (^{13}C) является ценной альтернативой протонному магнитному резонансу [33].

Для анализа были приготовлены водные и спирто-водные извлечения из травы золотарника канадского по методикам, представленными в Государственной фармакопее РФ XIV издания [17].

Осуществлена запись спектров магнитного резонанса ядер изотопа углерода-13 образцов водного и водно-спиртового извлечения травы золотарника канадского. В датчик спектрометра ЯМР помещали образцы извлечений в калиброванных ЯМР-ампулах диаметром 5 мм и заполненных на высоту 50 мм для записи спектров. Спектры ЯМР были записаны по стандартной одноимпульсной методике на спектрометре ЯМР высокого разрешения Bruker "AVANCE-300" при температуре пробы 25°C , при резонансной частоте ^{13}C 75,49 МГц, длительностью импульсов возбуждения 4 мкс (30-градусный импульс), с периодом следования импульсов 1 секунда, при числе накоплений сканов – 40000, с суммарной длительностью регистрации спектров 24 часа [42,50].

ЯМР ^{13}C - спектры регистрировали режиме широкополосного протонного подавления (сильное радиочастотное поле облучает всю область резонанса протонов). При этом возникает насыщение спинов протонов, а спин-спиновые взаимодействия ^{13}C - ^1H не проявляются. Таким образом стало возможным получение резонансных сигналов атомов углерода в виде синглетов вместо мультиплетов [42,50].

Все химические сдвиги δ в миллионных долях (м.д., ppm) приведены относительно тетраметилсилана как внешнего стандарта.

2.3.2. Дубильные вещества

Качественный анализ состава соединений группы дубильных веществ проводили ТСХ методом.

Для исследования дубильных веществ травы золотарника канадского методом ТСХ нами были использованы пластины с закрепленным слоем

силикагеля “Kromafil“ Merck (размером 20x10 см, с размером частиц 5-17 мкм). В данной работе использовали хроматографическую систему: н-бутанол – уксусная кислота – вода в соотношении 40:12:28. Смеси растворителей заливали в стеклянные камеры для хроматографии и насыщали их 24 часа [5,7,17,79].

Для исследования готовили извлечения из травы золотарника, используя в качестве экстрагента воду. Точную навеску (около 1 г) травы золотарника канадского кипятили в воде $V = 50$ мл на водяной бане 30 минут с обратным холодильником, охлаждали до комнатной температуры, а после фильтровали через бумажный фильтр. Доводили извлечения до метки (исследуемый раствор).

Параллельно готовили 0,05 % растворы пирогаллола, галловой кислоты, танина в 70 % этаноле. Данные растворы были использованы как растворы сравнения.

На линию старта пластины были нанесены по $V = 5$ мкл исследуемых растворов и по $V = 5$ мкл растворов сравнения, пластину высушивали до полного высыхания нанесенных растворов. Далее пластины с нанесенными пробами помещали в камеры с системой растворителей и хроматографировали восходящим методом.

Пластины были высушены в вытяжном шкафу до полного испарения растворителей. Для детектирования пятен хроматограммы были исследованы в видимом и УФ свете при длине волны 254 нм до и после обработки 1 % раствором хлорида железа в 96 % этаноле.

Количественное определение танинов проводили перманганатометрическим методом согласно методике ГФ РФ XIV издания, ОФС.1.5.3.0008.18 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах», метод 1. Для исследования использовалось различное по измельченности сырье золотарника канадского: менее 0,25 мм, 0,25-0,4 мм,

0,4-1 мм, 1-3 мм, 3-4 мм и более 4 мм. Анализу также было подвергнуто свежее сырье золотарника канадского.

Для сравнения типа экстрагирования нами также была использована методика, распространенная в народной медицине, настаивания сырья в термосе: около 2 г (точная навеска) измельченного сырья было помещено в термос. Далее добавляли свежeproкипяченную воду $V = 250$ мл в термос и выдерживали 24 часа. Извлечение фильтровали через вату в мерную колбу $V = 250$ мл, доводили объем до метки водой (исследуемый раствор). $V = 25$ мл исследуемого раствора и помещали в колбу $V = 1000$ мл, добавляли воды $V = 500$ мл, раствора индигосульфоксилоты $V = 25$ мл. Титрование проводили раствором 0,02 М калия перманганата до золотисто-желтого окрашивания.

Параллельно был проведен контрольный опыт в соответствии с ОФС.1.5.3.0008.18 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах», метод 1 [17].

Расчеты суммы дубильных веществ в пересчете на танин в свежем и высушенном сырье проводили по следующей формуле:

$$X, \% = \frac{(V - V_1) * 0,004157 * 250 * 100 * 100}{a * 25 * (100 - W)}$$

V – объем раствора $KMnO_4$ концентрацией 0,02 М, израсходованного на титрование извлечения, мл; V_1 – объем раствора $KMnO_4$ концентрацией 0,02 М, израсходованного на титрование в контрольном опыте, мл; 0,004157 – количество дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора калия перманганата 0,02 М (в пересчете на танин), г; a – навеска сырья, г; W – влажность растительного сырья, %; 250 – общий объем водного извлечения, мл; 25 – объем водного извлечения, взятого для титрования, мл.

Измерения были проведены с помощью автоматического титратора Аквилон АТП-02 (Россия).

Имеются данные о различных методиках определения дубильных веществ. Например, СФМ после реакции с железотартратным реактивом в

пересчете на галловую кислоту. Однако отвар после реакции с данным реактивом окрашивается сначала в фиолетовый, а затем цвет быстро переходит в зеленый цвет из-за содержания конденсированных дубильных веществ, что не позволяет нам увидеть максимум поглощения на соответствующей длине волны. Поэтому для определения дубильных веществ методом СФМ нами была выбрана запатентованная методика (Самылина И.А., Абоянц Р.К., Гринько Е.Н.) с осаждением дубильных веществ 1% раствором коллагена. Методика основана на измерении оптической плотности водных извлечений ЛРС при 277 нм (максимум поглощения водных растворов танина и галловой кислоты) [18].

Брали точную навеску измельченного сырья (около 2,0 г) с частицами, проходящими сквозь сито диаметром не более 3мм, помещали в мерную колбу $V = 500$ мл, заливали нагретой до кипения водой очищенной $V = 250$ мл, кипятили с обратным холодильником 30 минут периодически помешивая. Затем колбу с полученным содержимым охлаждали до комнатной температуры, содержимое фильтровали через вату, при этом отбрасывая первые 50 мл фильтрата. В мерную колбу $V = 50$ мл переносили аликвотную долю доводили объем до метки (раствор А). К $V = 30$ мл водного извлечения добавляется 1% раствор коллагена. Смесь взбалтывается в течение 60 минут, фильтруется через бумажный фильтр. Аликвотная доля переносится в мерную колбу $V = 50$ мл, доводится водой до метки (раствор Б). Оптическую плотность измеряли для обоих растворов на СФМ при длине волны 277 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали воду [18].

Рассчитывали содержание суммы всех дубильных веществ по формуле:

$$X = \frac{A_1 * 250 * 50 * 100}{m * V * 508 * (100 - W)}$$

где X_A - содержание суммы дубильных веществ в пересчете на галловую кислоту, %, A_1 - оптическая плотность раствора 1, m - масса навески сырья, г, V - объем аликвотной пробы, мл, 250 - общий объем

извлечения, мл, 50 - объем колбы, мл, 508 - удельный показатель поглощения галловой кислоты (оптическая плотность 1% раствора галловой кислоты 1 мг/мл), W - влажность сырья, %,

Далее к аликвотной доле извлечения добавляли 1% раствор коллагена в 1% уксусной кислоте, взбалтывали, фильтровали, измеряли оптическую плотность фильтрата при длине волны 277 нм и рассчитывали содержание осаждаемых дубильных веществ по формуле. Содержание дубильных веществ, осаждаемых раствором коллагена 1% в пересчете на галловую кислоту и абсолютно сухое сырье в процентах (X) в ЛРС определяют как разницу между содержанием дубильных веществ в растворах А и В.

$$X = \frac{(A_1 - A_2) * 250 * 50 * 100}{m * V * 508 * (100 - W)}$$

где X - содержание осаждаемых дубильных веществ в пересчете на галловую кислоту, %, A_1 - оптическая плотность раствора 1, A_2 - оптическая плотность раствора 2, m - масса навески сырья, г, V - объем аликвотной пробы, мл, 250 - общий объем извлечения, мл, 50 - объем колбы, мл, 508 - удельный показатель поглощения галловой кислоты (оптическая плотность 1% раствора галловой кислоты 1 мг/мл), W - влажность сырья, %.

2.3.3. Органические кислоты

Качественное определение органических кислот было проведено для травы золотарника канадского методом ВЭЖХ с использованием хроматографа «GILSON» (Франция) и программы «Мультихром» (на платформе «Windows») для обработки результатов исследования.

Для анализа была использована металлическая колонка размером 4.6 x 250 мм Kromasil C18, с размером частиц 5 мкм в качестве НФ. Температура колонки комнатная.

В качестве ПФ использовали фосфатный буферный раствор с рН 2,2 (27,2 калия дигидрофосфата помещают в мерную колбу $V = 1$ л, растворяют в воде очищенной $V = 500$ мл, доводят до метки тем же растворителем и

прибавляют ортофосфорную кислоту до рН 2,2). Скорость подачи элюента 1 мл/мин, время анализа составляло 20 минут. Обнаружение проводилось УФ-детектором при длине волны 210 нм.

Исследование проводили для водного извлечения травы золотарника канадского: брали точную навеску измельченного сырья (размер частиц не более 3 мм) (около 2,0 г) помещали в колбу $V = 200$ мл, прибавляли воды очищенной $V = 70$ мл, присоединяли к обратному холодильнику. Нагревание проводили на кипящей водяной бане в течение 1 часа. Затем смесь охлаждали, фильтровали в мерную колбу $V = 100$ мл через бумажный фильтр, доводили объём до метки водой (исследуемый раствор).

Готовили серию растворов сравнения СО («Sigma-Aldrich») органических кислот следующим образом.

По 0,025 г аскорбиновой, лимонной, щавелевой, яблочной (маликовой), янтарной, виннокаменной, галловой кислот помещали в мерную колбу $V = 50$ мл растворяли в 70% этанола $V = 25$ мл и доводили тем же растворителем до метки.

Исследуемый раствор $V = 20$ мкл и растворы сравнения органических кислот по $V = 20$ мкл вводили в хроматограф и хроматографировали по выше приведенной методике.

Количественное определение органических кислот проводили методом, описанным выше с расчетом площади пиков [123].

2.3.4. Флавоноиды

Качественный и количественный состав флавоноидов (агликонов и гликозидов) в листьях и цветках золотарника канадского методом определяли ВЭЖХ. Для определения флавоновых гликозидов (рутин, гиперозид, изокверцитрин, астрагалин, кверцитрин) образцы сырья (листья и цветки отдельно) массой по 0,5 г измельчали и помещали в круглодонную колбу с обратным холодильником, добавляли 50 мл 50%-го этанола и нагревали на водяной бане в течение 30 мин. Раствор количественно переносили в мерную колбу объемом 50 мл и доводили до метки 50%-м

этанолом. Затем колбу помещали на 5 мин в ультразвуковую баню. Полученные растворы (объем каждого составлял 1 мл) центрифугировали при 14000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость переносили в виалу для хроматографического анализа и проводили хроматографирование аликвоты (20 мкл) полученного раствора [84].

Для определения флавоноловых агликонов (кверцетин, кемпферол, изорамнетин) в цветках и листьях золотарника канадского образцы массой 0,5 г измельчали и помещали в круглодонную колбу с обратным холодильником, добавляли 50 мл смеси метанол : вода : соляная кислота (60:20:8) и нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 1,5 ч. Раствор количественно переносили в мерную колбу объемом 50 мл и доводили до метки смесью метанол : вода : соляная кислота (60:20:8). Затем колбу помещали на 5 мин в ультразвуковую баню. Полученные растворы (объем каждого составлял 1 мл) центрифугировали при 14000 об/мин в течение 10 мин. Надосадочную жидкость переносили в виалу для хроматографического анализа и проводили хроматографирование аликвоты (20 мкл) полученного раствора [84].

Условия хроматографирования: хроматографическая колонка 250×4,6 Phenomenex Luna 5 мкм C18(2); сорбент – октадецилсиликагель (5 мкм); скорость подачи подвижной фазы 1,0 см³/мин; УФ-детектирование, $\lambda = 365$ нм. Объем вводимой пробы 20 мкл [84].

Элюент – 68% трихлоруксусной кислоты (рН 2,5) и 32% ацетонитрила [84].

Определение флавоновых гликозидов и флавоноловых агликонов проводилось по сравнению времени удерживания стандартов данных веществ [84].

Качественный анализ состава флавоноидов проводили ТСХ методом [73]. Для исследования полифенольных соединений травы золотарника канадского методом ТСХ нами были выбраны пластины с закрепленным

слоем силикагеля “Kromafil“ Merck размером 20x10 см, с размером частиц 5-17 мкм.

Разделение веществ фенольной природы чаще всего осуществляют кислыми смесями растворителей. В данной работе использовали хроматографическую систему состава: этилацетат – уксусная кислота – вода в соотношении 7,5 : 1,5 : 1,5 [7]. Данную смесь растворителей заливали в стеклянные камеры для ТСХ и насыщали их в течение суток.

Для исследования около 1 г травы золотарника канадского кипятили в 50 мл раствора этанола 70% на водяной бане 30 минут с обратным холодильником, охлаждали до комнатной температуры, фильтровали через бумажный фильтр. Доводили раствор до метки (исследуемый раствор).

Параллельно готовили растворы сравнения: 0,05% растворы гиперозида, хлорогеновой кислоты, кверцетина, рутина, кофейной кислоты и лютеолина в 70 % этаноле.

Исследуемые растворы $V = 10$ мкл и растворы сравнения $V = 5$ мкл были нанесены на пластины, высушены до полного высыхания нанесенных растворов. Далее полученные пластины с нанесенными пробами были помещены в камеры с системой растворителей, и хроматографировали восходящим методом.

Далее пластины были высушены в вытяжном шкафу до полного удаления растворителей. Хроматограммы были осмотрены в видимом и УФ свете при длине волны 254 нм без дополнительной обработки реактивами.

Количественное содержание суммы флавоноидов в траве золотарника канадского определяли СФМ методом в пересчете на рутин по разработанной методике [109].

Для разработки методики количественного определения флавоноидов в пересчете на рутин 2-(3,4-дигидроксифенил)-5,7-дигидрокси-3-[α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 6)- β -D-глюкопиранозилокси]-4H-хромен-4-он) использовали траву золотарника канадского, собранную в Московской области в фазу цветения и плодоношения в 2017 году.

Спектрофотометрическое исследование было выполнено на приборе SPECORD 250 Analytik Jena AG (Germany) в кварцевых кюветах с толщиной слоя 10 мм в диапазоне длин волн 240-500 нм. Статистическую обработку осуществляли по методике, описанной в ГФ РФ. Валидация методики была проведена по параметрам линейность, повторяемость, воспроизводимость и правильность [109].

Точную навеску измельченного сырья травы золотарника канадского (около 1,0 г) помещали в конического колбу $V = 200$ мл. Затем прибавляли этанол $V = 100$ мл и взвешивали с погрешностью $\pm 0,01$ г. Далее колбу с сырьем и экстрагентом присоединяли к обратному холодильнику, нагревали на водяной бане в течение 30 минут, периодически помешивая. Извлечение охлаждали до комнатной температуры, затем взвешивали и при необходимости доводили массу до первоначальной спиртом концентрации, используемой для экстракции. Фильтрование проводили через бумажный фильтр в мерную колбу $V = 100$ мл так, отбрасывая первые 10 мл извлечения (раствор А). В 2 мерные колбы $V = 25$ мл помещали раствора А по $V = 1$ мл, в первую прибавляли $V = 2$ мл раствора $AlCl_3$ 2%, $V = 0,1$ мл уксусной кислоты разведенной 30%, доводили объем до метки в обеих колбах этиловым спиртом 96%, перемешивали (раствор Б) и оставляли в течение 25-30 минут. В качестве раствора сравнения использовали раствор из первой колбы без добавления раствора хлорида алюминия. Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре Analytik Jena при длине волны 410 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм [109].

Параллельно измеряется оптическая плотность раствора комплекса СО рутин с $AlCl_3$ по методике, описанной в ФС 2.5.0015.15 «Зверобоя трава – *Hyperici herba*» [109].

Содержание суммы флавоноидов (в пересчете на рутин) рассчитывали по формуле:

$$X, \% = \frac{A * a_0 * 100 * 1 * 25 * 100 * 100}{A_0 * a * 50 * 25 * 2 * (100 - W)}$$

где A – оптическая плотность раствора Б; 100, 50 и 25 – объемы мерных колб, используемых при анализе, мл; A_0 – показатель поглощения СО рутина при длине волны 410 нм; a – навеска сырья, г; 1 и 2 – объем извлечения, взятый для определения рутина и раствора Б, соответственно, мл; W – влажность сырья, %.

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

где A – оптическая плотность раствора Б; $A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения рутина при длине волны 410 нм равный 248; a – навеска сырья, г; 2 – объем извлечения, взятый для анализа раствора Б; W – влажность сырья, %.

2.3.5. Гидроксикоричные кислоты

Идентификацию гидроксикоричных кислот в траве золотарника проводили методом ВЭЖХ на хроматографе фирмы “GILSON“, (Франция) и программы «Мультихром» (на платформе «Windows») для обработки результатов исследования.

В качестве НФ была использована металлическая колонка размером 4.6x250 мм Kromasil C18, размер частиц 5 мкм. Температура колонки комнатная

В качестве ПФ использовался фосфатный буфер с рН 2,2. Для этого калия дигидрофосфата $m = 27,2$ г помещают в мерную колбу $V = 1000$ мл, растворяют в воде очищенной $V = 500$ мл, доводят до метки тем же растворителем и прибавляют кислоту ортофосфорную до рН 2,2. Скорость подачи элюента 1 мл/мин. Время анализа 20 минут. Обнаружение проводилось УФ-детектором при длине волны 210 нм.

Исследование проводили в извлечении 70% спиртом этиловым.

Для исследования была взята точная навеска высушенного и измельченного сырья травы золотарника канадского (около 2,0 г). Сырье помещали в колбу $V = 200$ мл, затем прибавляли раствор этанола 70% $V = 70$ мл, присоединяли к обратному холодильнику, нагревали на кипящей водяной бане в течение 1 часа. После охлаждения смесь фильтровали в мерную колбу $V = 100$ мл через бумажный фильтр и объём доводили спиртом 70% до метки (исследуемый раствор).

Также готовили серию растворов сравнения СО («Sigma-Aldrich») гидроксикоричных кислот следующим образом: кофейную, феруловую, хинную, хлорогеновую, цикориевую кислоты массой по 0,025 г помещали в мерные колбы $V = 50$ мл растворяли в 70% этаноле $V = 25$ мл и доводили тем же растворителем до метки.

Исследуемый раствор и растворы сравнения гидроксикоричных кислот $V = 20$ мкл вводили в хроматограф и хроматографировали по выше приведенной методике [131]. Результаты исследований приведены в таблицах и рисунках (раздел 4.2.5). Также выполнена разработка количественного определения гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую в траве золотарника канадского методом СФМ (глава 4) [84].

При определении экстрагента, который обеспечивает наибольший выход гидроксикоричных кислот исследовали спирто-водные извлечения, полученные при помощи 60%, 70% и 80% растворов этанола. Для проведения эксперимента была взята точная навеска измельченного сырья (около 1,0), помещали в колбу $V = 200$ мл, далее отмеряли $V = 50$ мл раствора этанола и прибавляли к сырью. Затем данную колбу присоединяли к обратному холодильнику, нагревали на водяной бане 30 минут, периодически помешивая. Извлечение оставляли для охлаждения до комнатной температуры, затем фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу $V = 100$ мл так. Экстракцию проводили еще дважды с $V = 30$ мл и $V = 20$ мл этилового спирта (трехкратная экстракция). Извлечение доводили до метки этанолом соответствующей концентрации (раствор А). 1 мл раствора А

помещали в колбу $V = 25$ мл и доводили объем до метки 96% этанолом и перемешивали (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряли при длине волны 330 ± 2 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали спирт этиловый 96%. Результаты исследования представлены в таблице 1.

Содержание гидроксикоричных кислот (в пересчете на хлорогеновую кислоту) рассчитывали по формуле:

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

где A – оптическая плотность раствора Б; 100 и 25 – объемы мерных колб, используемых при анализе, мл; $A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения хлорогеновой кислоты при длине волны 330 нм, равный 507; a – навеска сырья, г; 1 – объем извлечения, взятый для анализа, мл; W – влажность сырья, %.

2.3.6. Полисахариды

Качественное обнаружение полисахаридов проводили с помощью фитохимических реакций.

Количественное содержание проводили с помощью двух методик: методом спектрофотометрии и гравиметрией.

Количественное определение полисахаридов проводили методом СФМ, описанной в ГФ РФ XIV издания ФС 2.5.0027.15 «Мать-и-мачехи обыкновенной листья» [41].

Количественное определение полисахаридов гравиметрией проводилось методом, описанным в ГФ РФ XIV издания ФС 2.5.0032.15 «Подорожника большого листья» [41].

2.4. Минеральный состав

Объектами исследования являлись трава золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.), собранного в Москве, Московской области, Тульской области и Тверской области и травы золотарника карликового

(*Solidago nana* Nitt.), собранного в Тверской области. Сборы были поведены в августе-октябре 2017 года. Была проведена воздушно-тенева сушка данных объектов. Хранение проводилось в сухом прохладном месте.

Образцы сырья были измельчены и подвергнуты озолению в муфельной печи при доступе воздуха при температуре 450-500°C в течение 2 часов. Измерения проведены с погрешностью не более 2% в пересчете на золу.

Анализ минерального состава был осуществлен с помощью энергодисперсионного рентгенофлуоресцентного анализа (РФА-ЭД) на спектрометре Thermo Scientific Niton FXL 950. Прибор оснащен рентгеновской микротрубкой с Ag анодом (50 кВ/400 мкА/10 Вт), геометрически оптимизированным дрейфовым детектором большой площади (GOLDD) с высокими разрешающей способностью и скоростью счета (140 эВ на линии $K\alpha$ Fe; 200 000 импульсов в секунду). Охлаждение детектора – термоэлектрическое, на основе эффекта Пельтье (Peltier). В работе анализатора реализована технология автоматического выбора фильтров первичного излучения, что позволило оптимизировать параметры излучения для достижения максимальной чувствительности по каждому определяемому элементу. В спектрометре предусмотрены: опция локализации анализа на участке диаметром от 1 до 8 мм (коллиматор 1, 3 и 8 мм); система X-Y позиционирования; система вращения образцов внутри измерительной камеры во время анализа для получения более точного результата. Пробы анализировались в стандартных кюветах для РФА (d=25 мм, толщина майларовой пленки 6 мкм) в насыщенном слое (тип пробы – порошок). Для каждой пробы выполнялось два параллельных определения. Правильность измерений контролировалась использованием в качестве внешнего стандарта государственных стандартных образцов с аттестованными содержаниями элементов (ГСО растительности ТМЗг-01 (травосмесь, зола), ЗРЖ-01 (рожь, зола), К-02 (картофель, зола)).

2.5. Методы стандартизации сырья

По требованиям ОФС 1.1.0005.15 «Отбор проб лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» был проведен отбор проб для товароведческого анализа исследуемого сырья - золотарника канадского [17].

Определение числовых показателей качества сырья. Изучение числовых показателей проводили по методикам ГФ РФ XIV издания: ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»; ОФС.1.5.3.0005.15 «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»; ОФС.1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»; ОФС.1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратов» [17].

Для работы была использована следующая аппаратура: весы лабораторные A&D GF-1000 (Китай), весы аналитические OHAUS Pioneer PA-114 (Китай), сушильный шкаф Binder GmbH FD53 (Германия), муфельная печь LOIP LF 9/11 V1 (Россия).

Для определения *удельной массы* было взято 5,0 г сырья (точная навеска). Сырье помещали в пикнометр (объем пикнометра составлял 100 мл), затем в пикнометр добавляют воду очищенную так, чтобы занимаемый объем составлял $\frac{2}{3}$ от объема пикнометра, взвешивают, и выдерживают в течение 1,5 - 2 часов на кипящей водяной бане. При проведении эксперимента важно перемешивать содержимое пикнометра для удаления воздуха из сырья. После процедуры пикнометр охлаждают до 20 °С, доводят объем пикнометра до метки водой очищенной. Определяют массу пикнометра с водой и сырьем.

Измерение *насыпной массы* проводят по объему, занимаемому сырьем в мерном цилиндре с последующим взвешиванием сырья. Для этого помещают сырье в мерный цилиндр, слегка встряхивают для выравнивания слоя сырья на поверхности, определяют полный объем, который занимает сырье, а затем сырье взвешивают.

Для расчета *объемной массы* сырье массой около 10,0 г взвешивают (точная навеска), быстро помещают в мерный цилиндр с водой очищенной и определяют объем.

Вычисление *пористости* производят по частному разности удельной и объемной масс и удельной массы.

Значение *порозности* сырья вычисляют через отношение разницы между объемной и насыпной массами к объемной массе.

Свободный объем слоя сырья равен частному разности удельной и насыпной масс к удельной массе.

Для определения *коэффициентов поглощения экстрагентов* было взято измельченное сырье около 5,0 г, взвешенного с точностью до $\pm 0,01$ г. Навеска была помещена в мерный цилиндр. Мерный цилиндр заливали известным объемом экстрагента (вода и спирто-водные растворы 30, 50, 70, 96% (по объему)) таким образом, чтобы сырье было покрыто растворителем полностью, оставляют на несколько часов. После этого сырье фильтруют через бумажный фильтр. Для полученного фильтрата измеряют объем в другом мерном цилиндре [65].

Определение микробиологической чистоты сырья травы золотарника канадского проводили согласно статье ГФ РФ XIV издания ОФС.1.5.3.0002.15 «Определение степени зараженности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов вредителями запасов» [17].

Содержание радионуклидов в сырье травы золотарника канадского определяли по методике ГФ РФ XIV издания ОФС.1.5.3.0001.15

«Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [17].

2.6. Методы стандартизации спирто-водных извлечений

Описание внешнего вида спирто-водного извлечения.

Определение *плотности* проводят в соответствии с требованиями ОФС.1.2.1.0014.15 «Плотность» методом 1 или методом 3 [17].

Спирт этиловый. Испытание проводят в соответствии с ОФС «Определение спирта этилового в жидких фармацевтических препаратах».

Метанол и 2-пропанол. Испытания проводят согласно ОФС «Остаточные органические растворители» не более 0,05% метанола и не более 0,05% 2-пропанола [17].

Сухой остаток. Испытания проводят в соответствии с ОФС «Потеря в массе при высушивании» [17,40].

Тяжелые металлы. Испытания на тяжелые металлы проводят в соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [17].

Количественное определение флавоноидов 1,0 мл спирто-водного извлечения травы золотарника канадского помещают в мерную колбу $V = 25$ мл, доводят 70% спиртом до метки и перемешивают (раствор А). Отмеряют 1,0 мл раствора А и осторожно помещают в мерную колбу $V = 25$ мл, прибавляют 2% раствор $AlCl_3$ в спирте 96% $V = 3,0$ мл и разведенной 30% уксусной кислоты $V = 0,1$ мл и доводят объем полученного раствора до метки спиртом 96% и перемешивают (раствор Б). Спустя 30 минут измеряется оптическую плотность испытуемого раствора Б на спектрофотометре Analytik Jena при длине волны 410 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используется раствор следующего состава: в мерную колбу $V = 25,0$ мл помещают раствор А $V = 1,0$ мл, разведенной 30% уксусной кислоты $V = 0,1$ мл и доводят объем спиртом 96%.

Параллельно в тех же условиях измеряется оптическая плотность раствора комплекса СО рутина и $AlCl_3$. СО рутина (0,025 г точная навеска) помещается в мерную колбу $V = 100$ мл, добавляют спирт 96% $V = 85$ мл и растворяют при нагревании на водяной бане. Затем охлаждают раствор, доводят объем раствора до метки 96% этанолом и перемешивают (раствор А СО рутина). Далее в мерную колбу $V = 25$ мл помещали по 1,0 мл раствора А СО рутина, прибавляли 4 мл 2% спиртового раствора $AlCl_3$ в 95% этаноле, 0,1 мл 30% кислоты уксусной. Объем в колбах доводили до метки 95% этанолом, перемешивали и через 30 мин измеряли оптическую плотность. В качестве раствора сравнения используют раствор следующего состава: в мерную колбу помещают 1,0 мл раствора А СО рутина, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30%, доводят 96% этанолом до метки.

Содержание суммы флавоноидов (в пересчете на рутин) рассчитывали по формуле:

$$X, \% = \frac{A * a_0 * 1 * 25 * 25 * P * 100}{A_0 * a * 1 * 100 * 25 * 100}$$

где A – оптическая плотность раствора Б; A_0 – удельный показатель поглощения рутина при длине волны 410 нм; a – объем спирто-водного извлечения; a_0 – навеска СО рутина, г; P – содержание основного вещества в СО рутина, %.

2.7. Методы исследований биологической активности

Антиоксидантная активность травы золотарника канадского.

2,5 г (точная навеска) высушенного и измельченного сырья травы золотарника канадского помещают в колбу объемом 100 мл, добавляют 70% этанол и нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение часа. Полученное извлечение охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу объемом 25 мл, при необходимости доводят объем до метки 70% этанолом. Для оценки антирадикальной активности был выбран метод спектрофотометрии с

радикалом 2,2 – дифенил-1-пикрилгидразилом (DPPH), который имеет максимум поглощения при длине волны 517 нм.

К 2 мл исследуемого извлечения добавлялся раствор DPPH (Sigma-Aldrich, США) с концентрацией 0,5 мМ и объемом 2 мл (раствор в 96% этаноле) и определяли оптическую плотность полученной смеси на спектрофотометре Analytik Jena при длине волны 517 нм с толщиной слоя кюветы 10мм через каждые 15 минут в течение 1 часа. Степень ингибирования радикалов DPPH определяли по формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = \frac{A_{\text{контр}} - A_x}{A_{\text{контр}}} * 100\% ,$$

где $A_{\text{контр}}$ – значение адсорбции контрольного раствора, A_x – значение адсорбции после реакции через фиксированное время.

Контрольный раствор готовился смешением 2 мл раствора DPPH с концентрацией 0,5 мМ и 2 мл 96% этанола.

Антиоксидантная активность спирто-водного извлечения травы золотарника канадского.

Антиоксидантную активность спирто-водного извлечения исследовали *in vitro* на основе метода *Blois*, модифицированного *Hatano et al.* [82] со свободным радикалом 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (DPPH), который имеет фиолетовую окраску с максимумом поглощения при длине волны 517 нм.

Аликвотные доли спирто-водных извлечений, полученные способом № 1, описанным в разделе 5.2, были лиофилизированы (5, 10, 50, 100 мкг), а затем растворены в 1 мл метанола. Полученные растворы добавлялись к раствору DPPH (10 мкг, 1 мл метанола). Смесь перемешивалась, а затем измерялась интенсивность поглощения при длине волны 517 нм через 5, 10, 15 и 30 минут от начала реакции.

Определяли оптическую плотность полученной смеси на спектрофотометре Analytik Jena при длине волны 517 нм с толщиной слоя

кюветы 10 мм. Степень ингибирования радикалов DPPH определяли по формуле:

$$\% \text{ ингибирования} = \frac{A_{\text{контр}} - A_x}{A_{\text{контр}}} * 100\% ,$$

где $A_{\text{контр}}$ – значение адсорбции контрольного раствора, A_x – значение адсорбции после реакции через фиксированное время.

Контрольный раствор готовился смешением 10 мкг DPPH с 1 мл метанола.

Исследование антимикробной активности. Антимикробное действие спирто-водного извлечения исследовали методом агародиффузии в соответствии с МУК 4.2.3143-13 «Определение антибиотической активности ферментных препаратов микробного (бактериального и грибного) происхождения, предназначенных для использования в пищевой промышленности» В качестве тест – культур были использованы штаммы: *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 [38].

2.8. Статистическая обработка данных

Статистическую обработку всех экспериментальных данных проводили по методике ГФ РФ XIV издания при помощи критерия Стьюдента и критерия Фишера. Результаты считали достоверными при вероятности 95% ($p \leq 0,05$) [17].

ГЛАВА 3. МАКРОСКОПИЧЕСКОЕ И МИКРОСКОПИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СЫРЬЯ

Для стандартизации травы золотарника канадского необходимо провести исследование измельченного сырья *S. canadensis* L. Ранее анатомо-морфологический анализ сырья был проведен лишь для листьев золотарника канадского в ФС 42-2777-91 на траву золотарника канадского. Однако в данном НД отсутствует полное морфолого-анатомическое описание травы золотарника, что не соответствует современным требованиям качества, как и говорилось ранее [17,55]. В Европейской фармакопее (ЕФ) описывается микроскопический анализ только порошка травы золотарника канадского [99]. Чтобы статья соответствовала стандартам качества, нами было проведено полное анатомо-морфологическое исследование травы золотарника канадского по органам: листья, соцветия (цветки язычковые, трубчатые, листочки обертки), стебель (поперечный и продольный срезы), плоды [67].

Методика исследования соответствовала требованиям ГФ РФ XIV издания ОФС.1.5.1.0002.15 «Травы». Анализу подвергалось цельное и измельченное сырье, предварительно просеянное через сито (7мм), а также порошок (размер сырья, проходящее через сито 2 мм) [17,55].

3.1. Описание сырья травы золотарника канадского

Цельное сырье. Сырье травы золотарника канадского представляет собой цельное или частично измельченные цветоносные и олиственные побеги длиной до 30 см. Стебель простой, в сечении ребристый, поверхность ребристая, слабо опушенный, листорасположение очередное. Листья простые длиной 4-7 см, шириной 1-2 см, очередные, ланцетной формы, с клиновидным основанием, острой верхушкой, с пильчатым краем, бесчерешковые. Листья неопушенные, жилкование перистое, ярко-выражена главная жилка. Цвет с нижней стороны светло-зеленый, с верхней – зеленый. Соцветие представляет собой корзинку на ножке, собранные в изогнутые

кисти. Возможно присутствие отдельных бутонов и незрелых плодов. Корзинка размером 5-7 мм состоит из ложноязычковых и трубчатых цветков и листочков обертки. Цветонос бледно-зеленый, опушенный, гладкий. Цветки желтые (краевые - ложноязычковые и срединные - трубчатые), обоеполые. Трубчатый цветок простой, актиноморфный. Венчик состоит из пяти сросшихся лепестков. Тычинок пять. Пестик один, завязь нижняя. Длина цветка 2-3 мм. Ложноязычковый цветок простой, зигоморфный. Венчик с тремя зубчиками. Тычинки отсутствуют, пестик один. Длина цветка 2-3 мм. Листочки обертки овальной формы длиной 2 мм, шириной 0,5 мм бледно-зеленого цвета. Плод семянка с хохолками. Цвет зеленовато-желтый. Запах слабый. Вкус горьковатый.

Измельченное сырье представляет собой кусочки листьев, стеблей, соцветий, незрелых плодов. Цвет измельченного сырья зеленовато-желтый с белыми частями стебля. При рассмотрении под лупой ($\times 10$) нами отмечены кусочки листьев зеленого цвета, кусочки стеблей зеленовато-белого цвета, соцветия корзинки, желтые цветки, листочки обертки. Запах слабый. Вкус горьковатый. На рисунке 4 представлено цельное и измельченное сырье травы золотарника канадского.



Рисунок 4. Сырье золотарника канадского: слева – цельное, справа – измельченное.

Порошок травы золотарника канадского представляет собой кусочки листьев, стеблей, соцветий, незрелые плоды и их части. При рассмотрении под лупой (10×) нами отмечены кусочки листьев от светло-зеленого до зеленого цвета; части бутонов желтого цвета; кусочки цветоносов и стеблей, чаще в продольном сечении, беловатого цвета, снаружи – от светло-зеленого до коричневого цвета; лепестки, их кусочки желтого цвета (можно отметить трубчатые и язычковые цветки); отдельные листочки обертки светло-зеленого цвета, изредка – незрелые плоды коричневого цвета с белым хохолком. Цвет порошка зеленый с белыми и желтыми вкраплениями. Запах слабый, своеобразный, вкус горьковатый.

3.2. Описание микроскопии травы золотарника канадского

Одновременно с микроскопическим исследованием сырья проводилось также гистохимическое исследование листьев и цветков травы золотарника. Были приготовлены микропрепараты листа с поверхности, поперечный срез стебля, микропрепарат стебля с поверхности, микропрепарат листочков обертки с поверхности, трубчатых цветков, ложноязычковых цветков. Для этого проводилось окрашивание микропрепаратов листа с поверхности, микропрепаратов трубчатого цветка, ложноязычкового цветка и листочков обертки суданом III.

3.2.1. Описание микроскопии листа

Микроскопия листа представлена на рисунке 5. Клетки верхнего эпидермиса листа представлены полигональными с слабоизвилистыми стенками, с нижней стороны листа клетки эпидермиса извилистые. С обеих сторон клетки эпидермиса со складчатой кутикулой с бурым содержимым в клетках, с равномерным утолщением стенок. Над главной жилкой клетки эпидермиса полигональные, неизвилистые, над мелкими жилками клетки эпидермиса прямые, вытянутые. Устьичный комплекс аномоцитный: замыкающие клетки окружены 4-5 околоустьичными клетками. Клетки устьиц округлые. На нижней стороне листа устьиц больше ($510 \times 1 \text{ мм}^2$), чем

на верхней ($344 \pm 1 \text{ мкм}^2$). Размер устьиц с нижней стороны $12 \times 14 \text{ мкм}$, с верхней $10 \times 11 \text{ мкм}$, над жилкой $5 \times 6 \text{ мкм}$. Устьица не погружены в эпидермис. По краю листа располагаются многоклеточные простые волоски из толстостенных клеток с бурым содержимым. На поверхности эпидермиса имеются простые многоклеточные тонкостенные волоски, у некоторых простых волосков верхняя клетка со спадающимися стенками (в некоторых случаях верхняя клетка отваливается). Основание волосков окружено розеткой клеток эпидермиса (5-7 клеток). Под эпидермисом встречаются схизогенные вместилища округлой и вытянутой формы с зеленовато-бурым содержимым, которые окрашиваются суданом III в оранжевый цвет. Также в листьях золотарника обнаруживаются в большом количестве капли каротиноидов желто-золотистого цвета, которые также окрашиваются суданом III в оранжевый цвет.

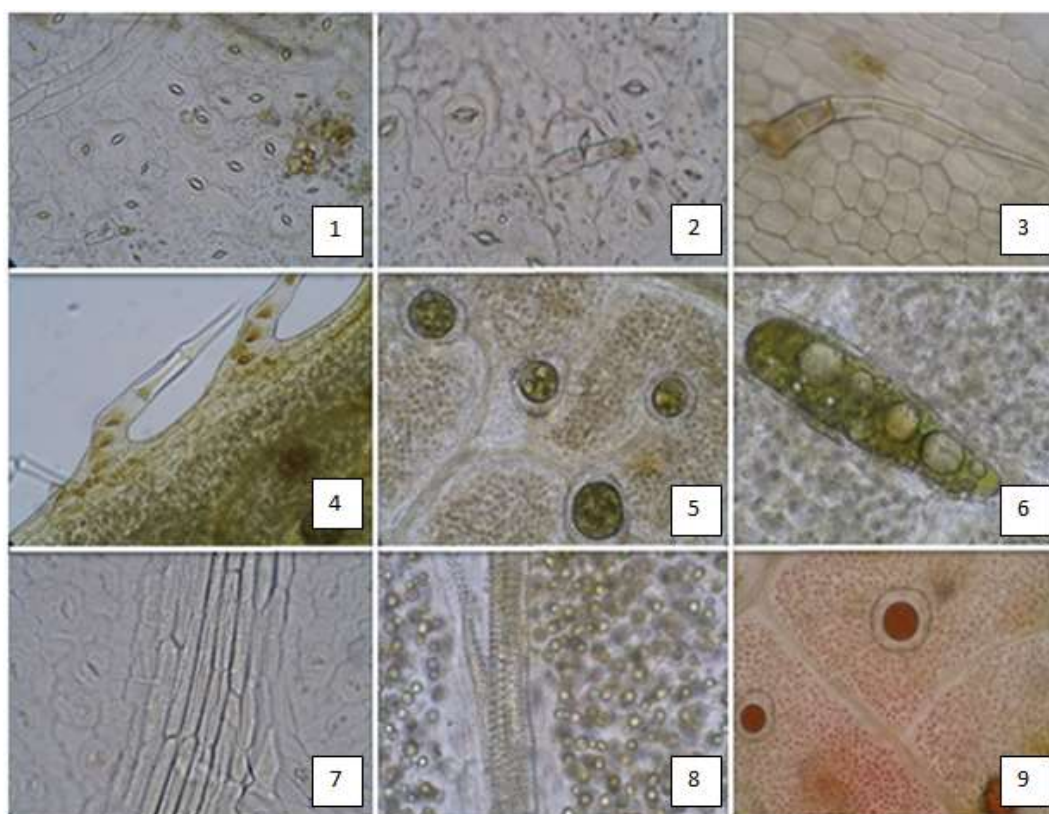


Рисунок 5. Микроскопия листа золотарника канадского

1 – нижний эпидермис листа (ув. $\times 200$), 2 – верхний эпидермис листа с простым многоклеточным тонкостенным волоском (ув. $\times 400$), 3 – простой многоклеточный волосок (ув. $\times 200$), 4 – край листа (простой многоклеточный волосок) (ув. $\times 200$), 5 – вместилища листа (ув. $\times 200$), 6 – вместилища листа (ув. $\times 400$), 7 – эпидермис над жилкой (ув. $\times 200$), 8 – жилка листа (ув. $\times 400$), 9 – окрашивание листа суданом III (ув. $\times 200$)

3.2.2. Микроскопия стебля

При рассмотрении препарата стебля с поверхности эпидермис стебля состоит из полигональных неизвилистых клеток, устьичный комплекс анамоцитного типа (длиной 10-12 мкм, шириной 10-14 мкм). Также на эпидермисе располагаются толстостенные многоклеточные волоски и тонкостенные простые многоклеточные волоски, верхняя клетка которых со спадающимися клетками.

При рассмотрении продольного среза стебля отмечены сосуды со спиральным и лестничным утолщением в диаметре 6-40 мкм.

На поперечном срезе стебель имеет пучковое строение (рисунок 6). Покровная ткань представлена эпидермисом – один ряд клеток прямоугольной формы. Под эпидермисом располагается колленхима. Проводящая система представлена крупными открытыми коллатеральными сосудисто-волокнистыми пучками. Над сосудисто-волокнистыми пучками располагается механическая ткань - перециклическая склеренхима, а между пучками – межпучковая склеренхима. Сердцевина представлена основной паренхимой.

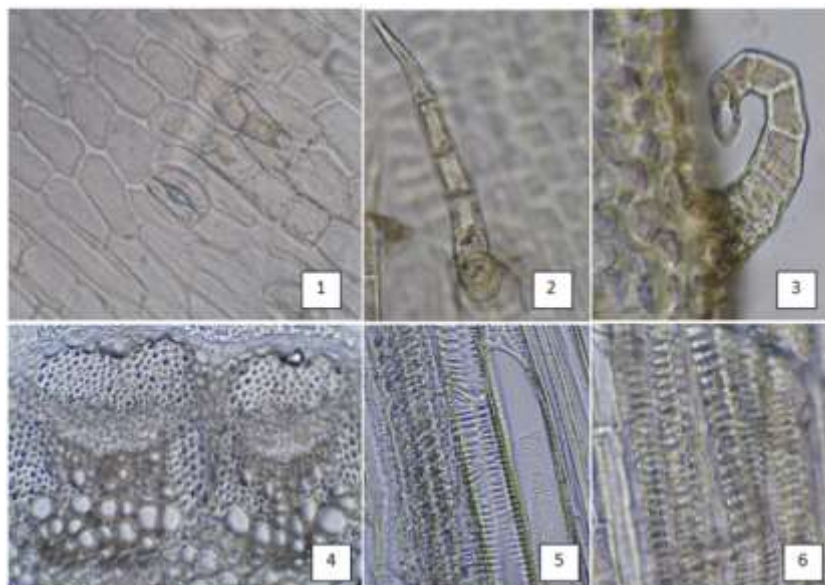


Рисунок 6. Микроскопия стебля золотарника канадского

1 – эпидермис стебля (ув. x200), 2 – эпидермис стебля (ув. x400), 3 – поперечный срез стебля (ув. x200), 4 – поперечный срез стебля, сосудисто-волокнистые пучки (ув. x200), 5 – продольный срез стебля сосуды, спирального и лестничного типа (ув. x200), 6 – продольный срез стебля, сосуды спирального (ув. x200).

3.2.3. Микроскопия соцветия

Также проведен микроскопический анализ листочка обертки (рисунок 7). Листочек обертки состоит из эпидермиса с полигональными клетками на нижнем и верхнем эпидермисе, простые многоклеточные волоски в верхней части листочка обертки, сросшиеся волоски по краю листа. Устьичный комплекс аномоцитного типа, устьица погружены в эпидермис. Также как и в листе имеются капли каратиноидов и схизогенные вместилища по центру листочка обертки, окрашиваемые суданом III в оранжевый цвет. Проводящая система представлена трахеидами вдоль листочка обертки.

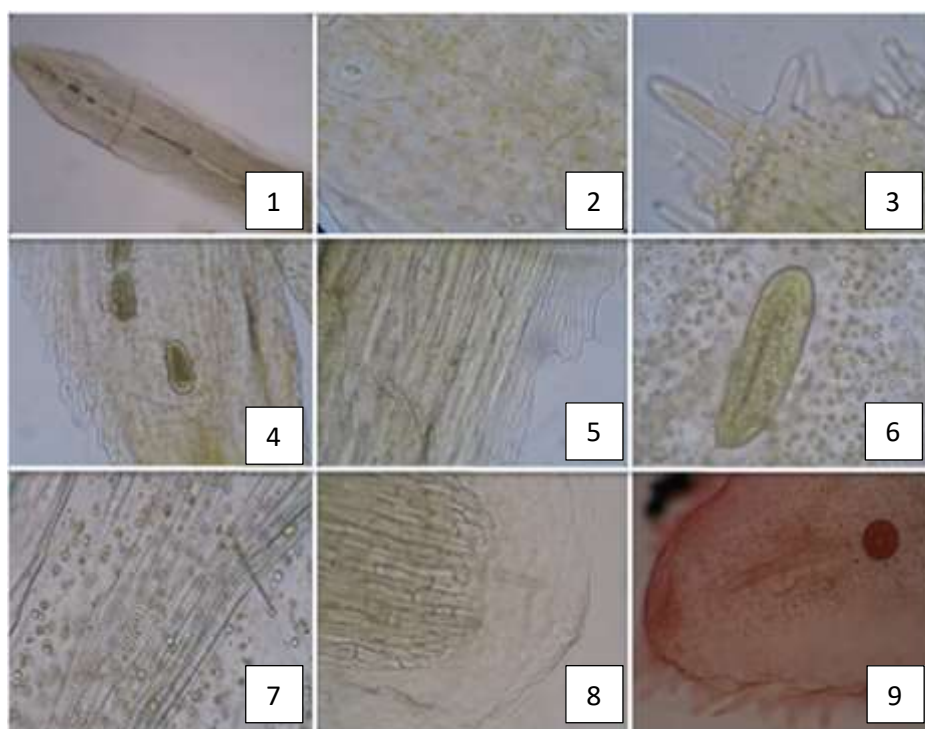


Рисунок 7. Микроскопия обертки соцветия золотарника канадского 1 – обертка (ув. x40), 2 – эпидермис обертки (ув. 400), 3 – волоски обертки (ув. x400), 4 – вместилища обертки (ув. x200), 5 – край листочка обертки, сросшиеся волоски (ув. x400), 6 – вместилище обертки и включения эфирного масла (ув. x400), 7 – жилка обертки (ув. x400), 8 – нижняя часть обертки (ув. x400), 9 – окрашивание суданом III (ув. x200).

Эпидермис ложноязычковых цветков состоит из прямоугольных клеток. Устьиц не наблюдалось. Клетки лепестков содержат многочисленные капли каратиноидов желто-золотистого цвета, окрашиваемые суданом III в оранжевый цвет. Края клеток ровные, неизвилистые. Хохлатки двойные и

сросшиеся. Длина 170 мкм, ширина 40 мкм. У основания цветка имеются 2 извилистые жилки. Иногда обнаруживается плод – семянка с одноклеточными волосками и вместилищами, которые при окрашивании суданом III становятся оранжевого цвета. Микроскопия ложноязычкового цветка представлена на рисунке 8.

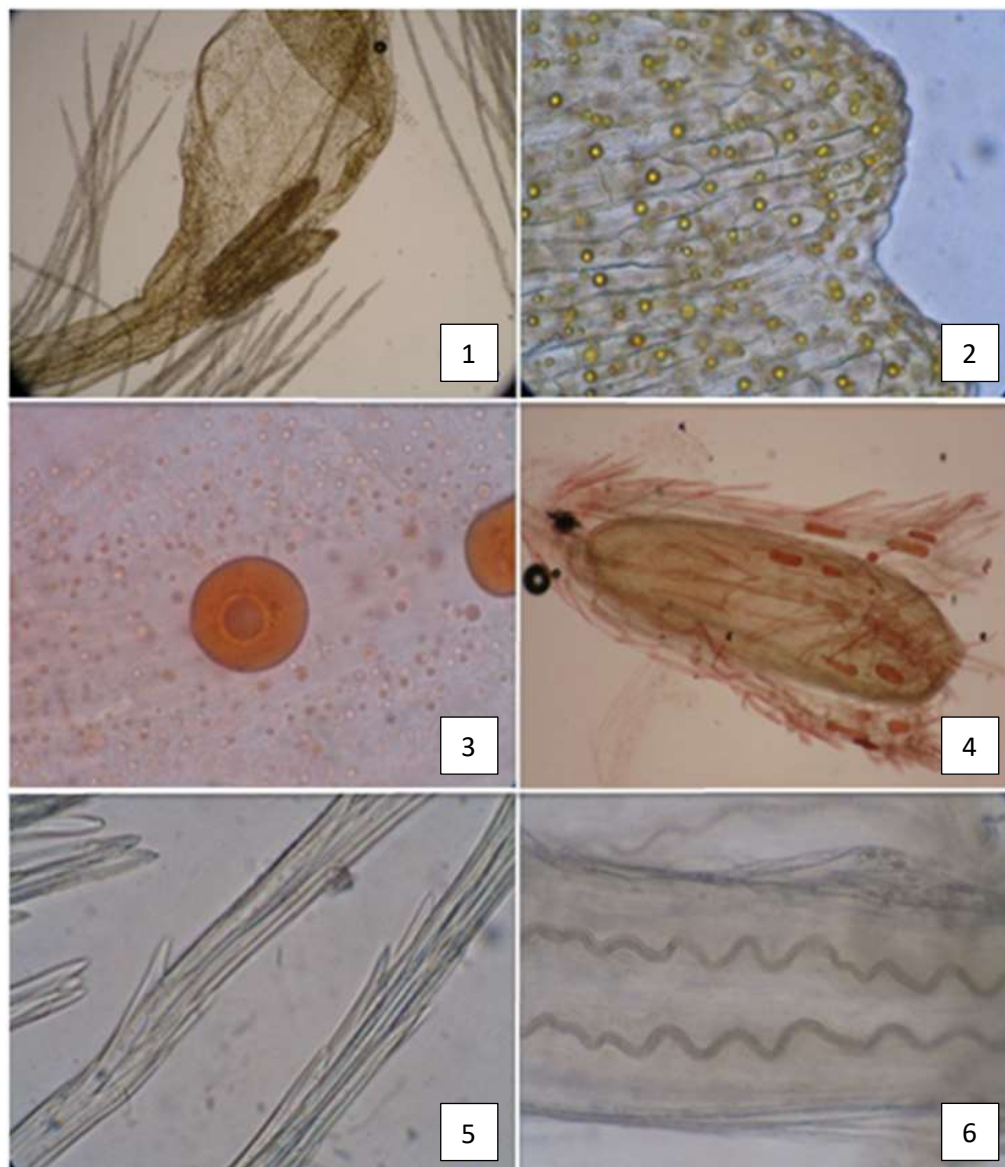


Рисунок 8. Микроскопия ложноязычкового цветка золотарника канадского

1 – ложноязычковый цветок (ув. х40), 2 – эпидермис лепестка (ув. х400), 3 – эпидермис обертки после окрашивания суданом III (ув. х200), 4 – плод – семянка после окрашивания суданом III (ув. х200), 5 – сросшиеся хохлатки (ув. 400), 6 – спирально закрученные жилки (ув. х200).

Трубчатые цветки имеют клетки эпидермиса различной формы (от округлых до многоугольных и вытянутых) с равномерным утолщением клеток (рисунок 9). Устьица не обнаружены. Вдоль краев лепестков располагаются схизогенные вместилища с зеленоватым содержимым. Каждый цветок имеет 5 тычинок и 2 пестика с сосочковидными выростами. У основания цветка имеются 5 пар спирально-закрученных жилок. При окрашивании суданом III, вместилища и капли окрашиваются в оранжевый цвет.

Встречается пыльца округлой формы 8-10 мкм, с шиповатым краем.

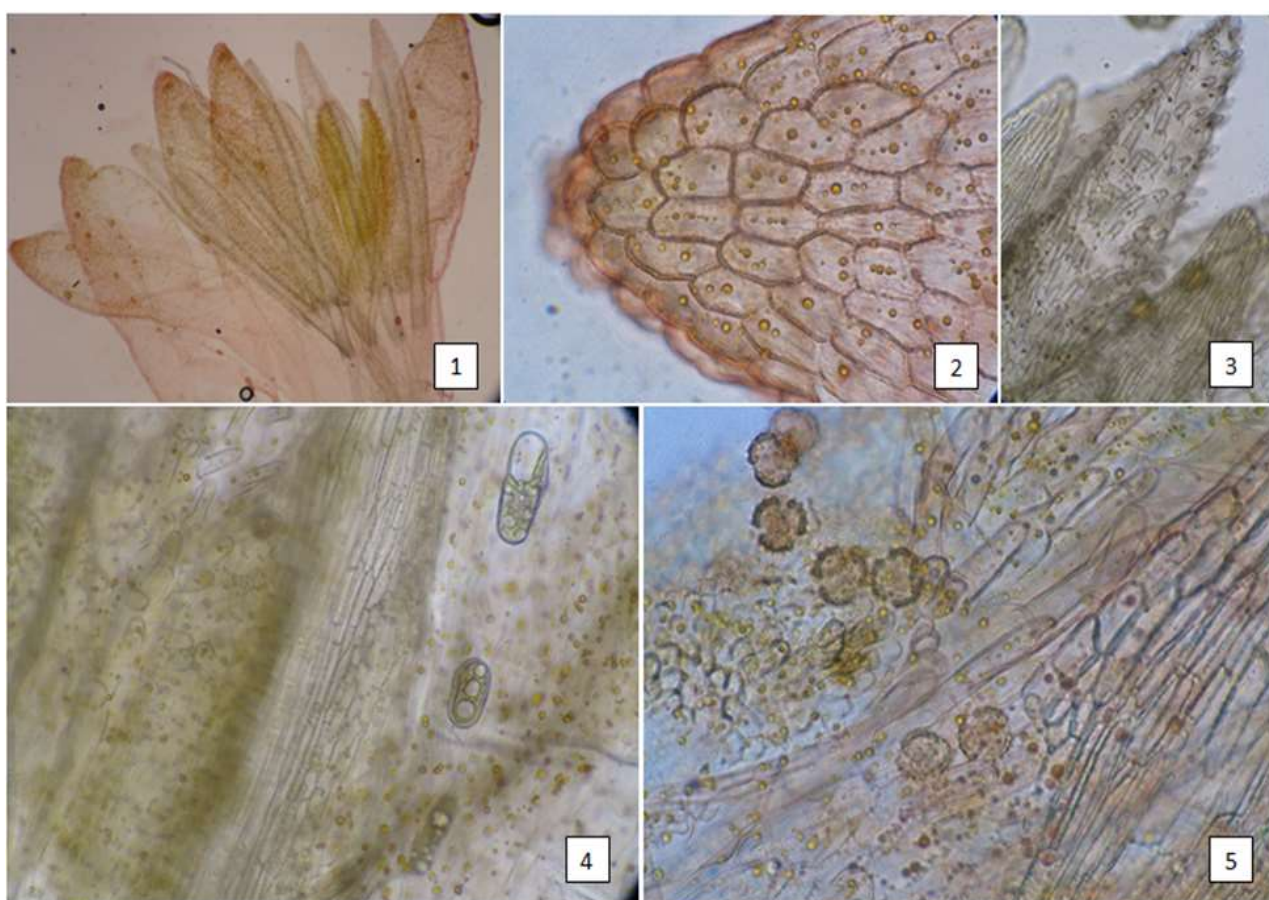


Рисунок 9. Микроскопия трубчатого цветка

1 – микропрепарат трубчатого цветка после окрашивания суданом III (ув. х40), 2 - эпидермис лепестка после окрашивания суданом III (ув. х400), 3 – сосочковидные выросты пестика (ув. х200), 4 – схизогенные вместилища (ув. х200), 5 – пыльца (ув. х200).

3.3. Микроскопия порошка

В результате микроскопического исследования порошка травы золотарника были обнаружены фрагменты листовых пластинок, стебля, листочков обертки, цветков, проводящей системы, характерные особенности анатомического строения которых описаны выше (рисунки 10-11).

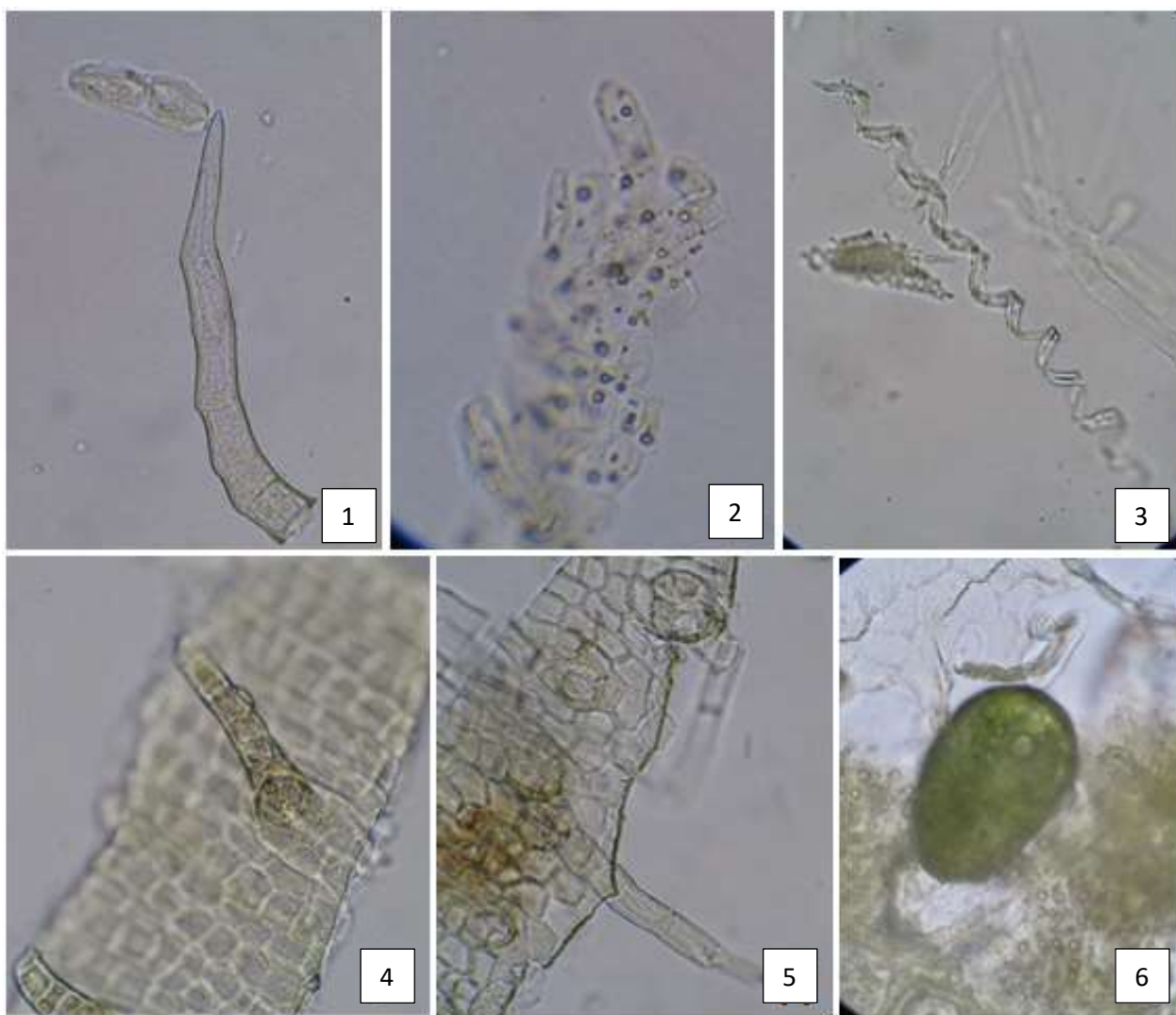


Рисунок 10. Микроскопия порошка *S. canadensis* L. (увел.*400): 1 - простой волосок листа; 2 - эпидермис венчика; 3 – спиральный сосуд ксилемы; 4 – эпидермис стебля; 5 – эпидермис листа; 6 – схизогенноеместилище листа.

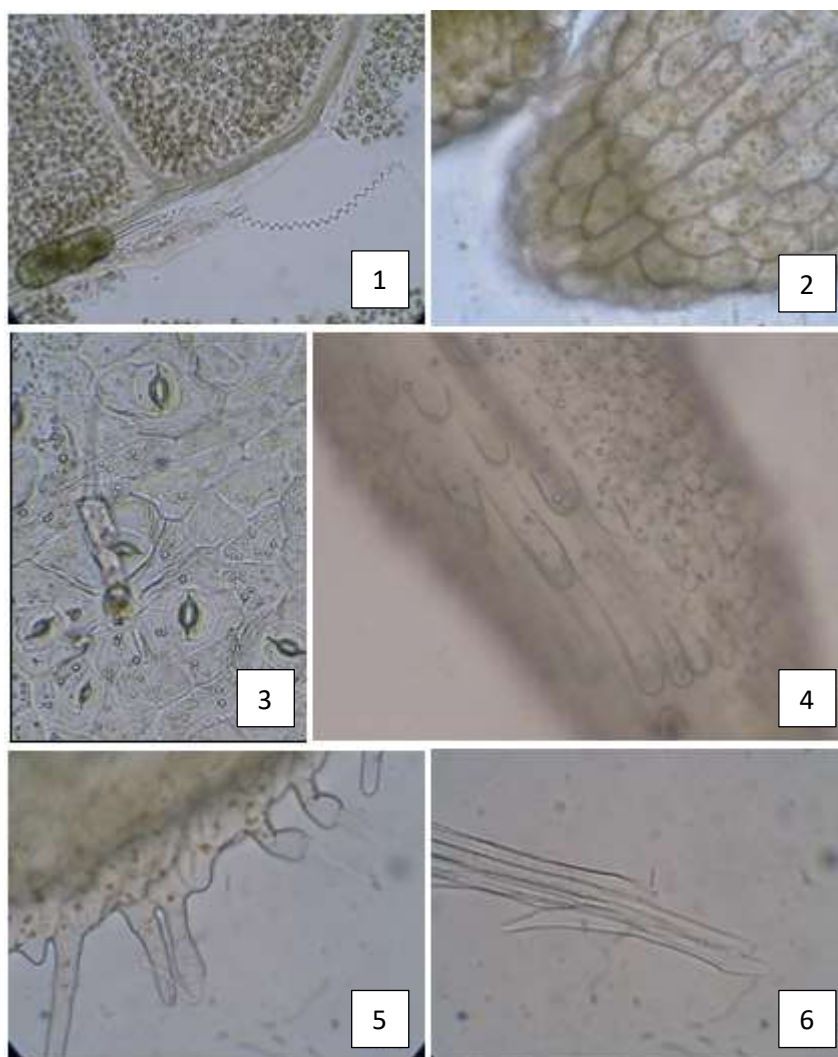


Рисунок 11. Микроскопия порошка *S. canadensis* L.

1 – эпидермис листа с поверхности (увел*200); 2 – эпидермис венчика трубчатого цветка (увел*400); 3 - устьичный аппарат, простой тонкостенный волосок со спадающими стенками верхней клетки (увел.*400); 4 – сосочковидные выросты (увел.*400); 5 – край листочка обертки с волосками (увел.*400), 6 – хохлатки плода.

В результате микроскопического исследования травы золотарника канадского нами были определены характерные особенности анатомического строения листьев, цветков, стеблей. Данное описание анатомо-диагностических признаков может быть полезно для составления нормативной документации на траву золотарника канадского.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. Описаны морфологические признаки травы золотарника канадского: стебля, листьев, соцветия.
2. Проведено углубленное изучение анатомо-диагностических признаков ЛРС травы золотарника канадского: строение верхнего и нижнего эпидермиса листьев, строение поперечного среза стебля, строение эпидермиса стебля, строение обертки соцветий, строение ложноязычковых цветков, строение трубчатых цветков, строение плодов.
3. Проведено углубленное изучение микроскопических анатомо-диагностических признаков измельченного ЛРС травы золотарника канадского и порошка ЛРС травы золотарника канадского.
4. В качестве идентификационных и диагностических признаков рекомендуется комплекс признаков, присутствующих в листьях, цветках, листочках обертки, стебля, которые вошли в проект НД (приложение 4).

ГЛАВА 4. ИДЕНТИФИКАЦИЯ И ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАВЫ ЗОЛОТАРНИКА КАНАДСКОГО ДЛЯ РАЗРАБОТКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ

Из данных, приведенных в обзоре литературы, следует, что золотарник канадский является перспективным сырьем для внедрения в медицинскую практику в стоматологические препараты на его основе для профилактики и лечения воспалительных заболеваний пародонта.

Исследования и многолетний опыт применения золотарника канадского в народной и официальной медицине показывают широкий спектр фармакологического действия: диуретическое, потогонное, антисептическое, противовоспалительное, вяжущее, отхаркивающее, гемостатическое.

Однако лекарственной субстанции и лекарственной формы для лечения в стоматологии не разработаны до сих пор. Для решения данной проблемы необходимо проведение исследований по фитохимическому изучению растительного сырья, спирто-водных извлечений на его основе, влиянию различных факторов на выход БАВ, выбору адекватных ЛФ. Также необходима разработка методов оценки качества выше указанных ЛФ, учитывая принцип унификации методик в ряду ЛРС-субстанция-ЛП.

4.1. Профиль ЯМР-спектроскопии травы золотарника канадского

На рисунке 12 приведены обзорные спектры ЯМР ^{13}C с широкополосным подавлением протонов водного и спирто-водного извлечения из золотарника канадского. Из сравнения спектров следует, что число сигналов в водном образце (более 45) меньше числа сигналов в спирто-водном извлечении (более 57 сигналов), сигналы двух образцов, как правило, не совпадают по значениям химических сдвигов. Из этого следует, что извлечения двух образцов существенно отличаются по своему составу [42,50].

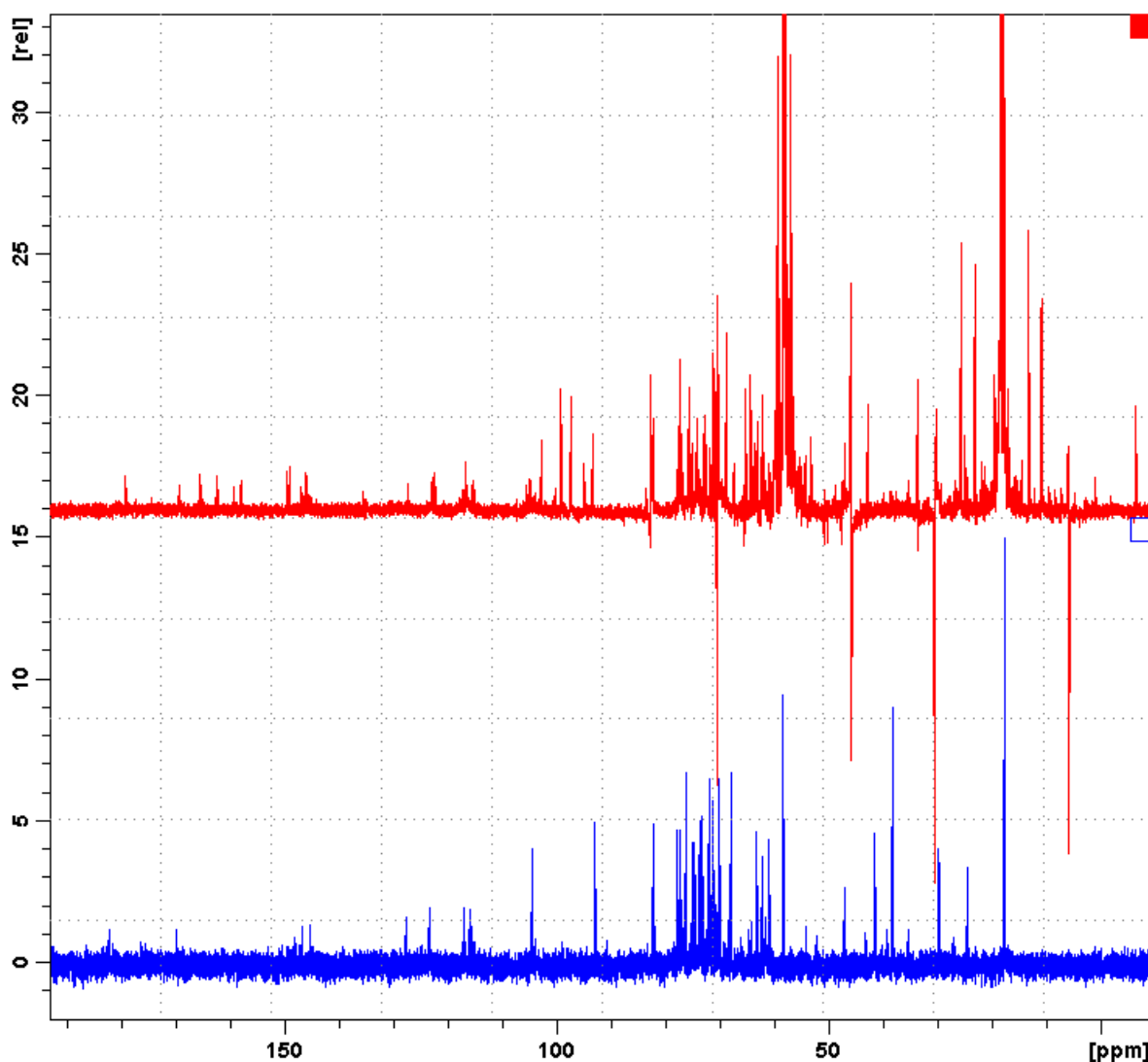


Рисунок 12. Обзорные спектры ЯМР ^{13}C с широкополосным подавлением протонов растворов образцов - 1) водное извлечение канадского золотарника (нижний спектр), 2) спирто-водное извлечение из травы золотарника канадского (верхний спектр).

Более отчётливо имеющиеся различия просматриваются при сопоставлении растянутых спектров водного и спирто-водного извлечений, которые представлены на рисунке 13 в виде трёх частей **I**, **II** и **III**, соответственно, в интервалах химических сдвигов С-13 0-50, 50-100 и 100-200 м.д. Химические сдвиги в м.д. сигналов С-13 на рисунках 12 и 13 приведены над спектрами [42,50].

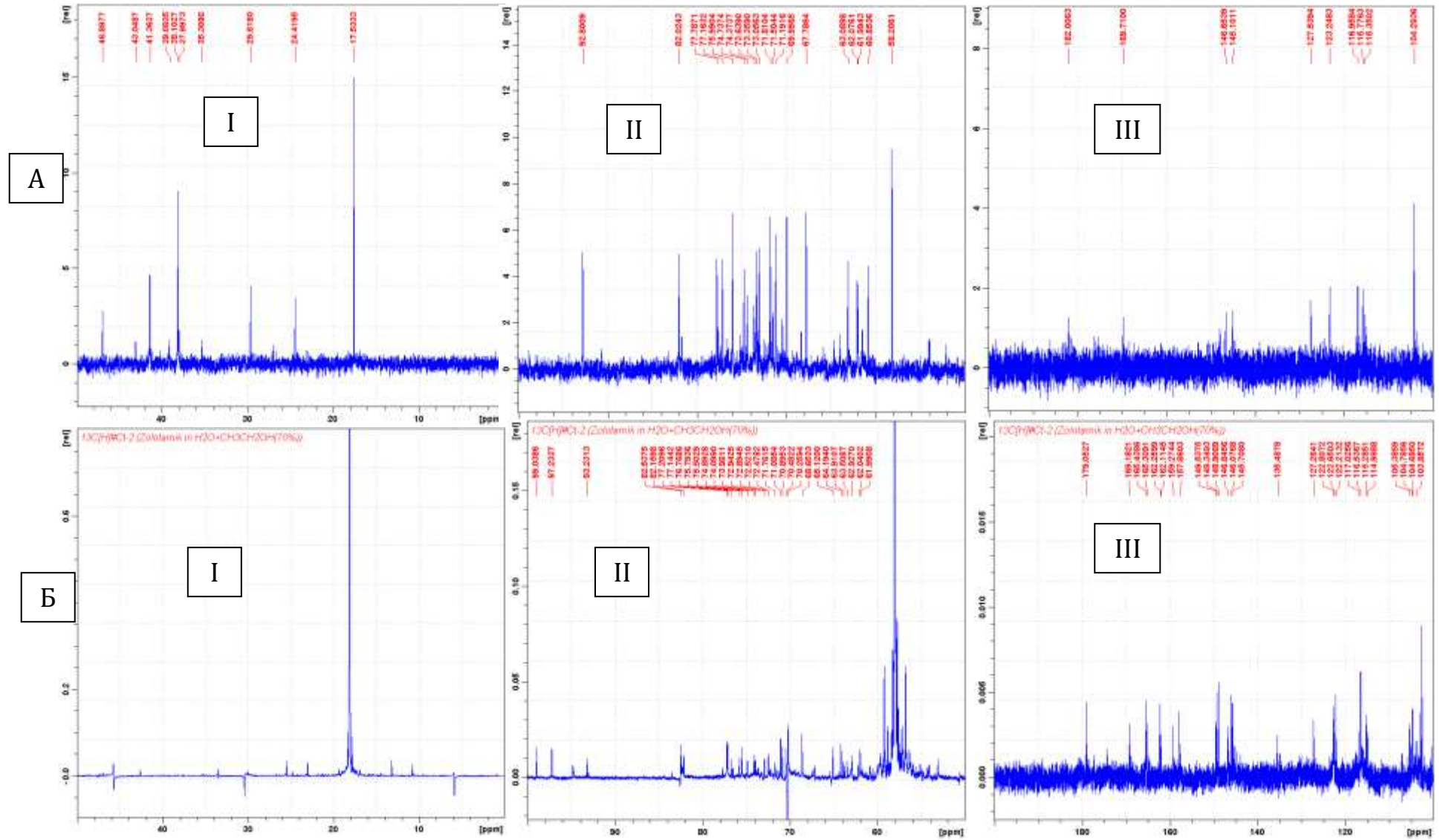


Рисунок 13. Растянутые спектры ЯМР ^{13}C (75,49 МГц) с широкополосным подавлением протонов извлечений золотарника: А – водное извлечение, Б – спирто-водное извлечение. Отнесение диапазонов I, II и III в тексте.

Как известно, использованные нами экстрагенты обладают неодинаковой избирательностью по отношению к спектру извлекаемых веществ. Считается, что вода достаточно полно растворяет большинство важнейших действующих веществ (гликозиды, сапонины, соли алкалоидов, гормоны и т.д.), но в значительно меньшей степени это относится к токоферолам, каротиноидам, фосфолипидам и целому ряду других классов органических соединений. Способность воды извлекать большое количество балластных веществ, отсутствие у неё бактерицидных свойств и высокая гидролитическая активность позволяют предположить, что при получении комплекса биологически активных веществ золотарника в качестве экстрагента следует использовать водно-спиртовую смесь [42,50].

В целом предварительное отнесение сигналов спектров ЯМР водного и спирто-водного извлечений из золотарника, сделанное на основе фундаментальных сведений по химическим сдвигам ^{13}C различных групп органических молекул [57], соответствует литературным данным [83,85] о присутствии разнообразных представителей полифенольных соединений, тритерпеновых сапонинов, ароматических структур, широкого спектра карбоновых кислот. Более высокая информативность спектра ЯМР ^{13}C спирто-водного извлечения позволяет использовать набор химических сдвигов $\text{C}-13$ для предварительной паспортной идентификации лекарственных форм на основе золотарника канадского. Данное исследование является опережающей стандартизацией, перспективным для дальнейшего использования [128].

4.2. Фитохимическое изучение сырья золотарника канадского

Химический состав растений рода золотарник подробно изучен различными группами авторов. Однако углубленное фармакогностическое изучение травы золотарника канадского, которое было бы направлено на изучение влияния факторов на выход БАВ, получение рациональных ЛС, совершенствование методов идентификации сырья и ЛС на его основе не

было проведено, поэтому нами была поставлена соответствующая для исследований.

Для проведения фитохимических испытаний нами были получены водные и спирто-водные извлечения из травы золотарника канадского, приготовленные согласно методикам, приведенным в ГФ РФ XI, XIII и XIV изданий.

Для приготовлений водных извлечений было взято примерно 5,0 г измельченной травы золотарника канадского. Затем сырье заливали водой очищенной $V = 50$ мл и нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником в течение 1 часа. Извлечение после охлаждения до комнатной температуры фильтровали через бумажный фильтр, траву снова заливали водой очищенной $V = 50$ мл и экстрагирование проводили еще 2 раза. Водные извлечения объединяли и упаривали под вакуумом до $V = 25$ мл. Полученные водные извлечения использовали для качественных реакций на группы БАВ: дубильные вещества, органические кислоты, полисахариды.

Для приготовления спирто-водных извлечений было взято 5,0 г измельченной травы золотарника канадского. Экстракция проводилась 70% раствором этилового спирта $V = 50$ мл. Сырье с экстрагентом нагревали с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 1 часа. Извлечение после охлаждения до комнатной температуры фильтровали через бумажный фильтр, заливали снова 70% раствором спирта $V = 50$ мл и экстрагирование повторяли 2 раза. Спирто-водные извлечения объединяли и упаривали под вакуумом до $V = 25$ мл и использовали для определения флавоноидов, гидроксикоричных кислот.

С полученными извлечениями были проведены качественные реакции. Результаты предварительного фитохимического анализа представлены в таблице 5.

Таблица 5 - БАВ, обнаруженные фитохимическим анализом

Группа БАВ	Методика качественных реакций	Результат проведенной реакции
Дубильные вещества, гидроксикоричные кислоты	1. К 3 мл извлечения добавляют по каплям 1% раствор желатина.	Появляется муть, которая исчезает при добавлении избытка раствора желатина
	2. К 3 мл извлечения добавляют 5 капель раствора железоммонийных квасцов.	Черно-синее окрашивание, переходящий в черно-зеленое
	3. К 3 мл извлечения добавляют несколько капель 1 % раствора антипирина	Аморфный осадок
	4. К 3 мл извлечения добавляют 1 мл 10% раствора ацетата свинца	Осадок
Флавоноиды	1. Цианидиновая проба: к 3 мл извлечения добавляют магний (10-15 мг) и 5-7 капель концентрированной соляной кислоты. Смесь подогревают на водяной бане 2-3 минуты	Раствор окрашивается в красный цвет
	2. К 3 мл извлечения добавляют 10-15 мг цинка и 5-7 капель концентрированной соляной кислоты, подогревая смесь 2-3 минуты	Оранжевое окрашивание
	3. К 2 мл извлечения прибавляют 5 капель 5% раствора среднего ацетата свинца	Желто-оранжевое окрашивание
Полисахариды	1. К объему водного извлечения добавляют трехкратный объем 96% этанола.	Осадок

4.2.1. Качественное и количественное определение дубильных веществ

Дубильные вещества являются полифенольными соединениями группы катехинов. Дубильные вещества известны противовоспалительным, антикоагулирующим, вяжущим, антисептическим свойствами. В настоящее время в исследованиях широко изучается антиоксидантная активность данной группы БАВ, а также применяется в медицинской практике. Поэтому считаем необходимым анализ дубильных веществ в траве золотарника канадского.

Качественный анализ

Количественное содержание дубильных веществ было определено двумя способами согласно ГФ РФ XIV:

- 1) метод перманганатометрического титрования в пересчете на танин (глава 2, раздел 2.3.1);
- 2) метод спектрофотометрии в пересчете на галловую кислоту.

Нами было проанализировано 6 серий.

Проведена статистическая обработка полученных данных с расчетом относительной ошибки исследования. Результаты исследований представлены в таблицах 6 – 7 [64,70,72].

Таблица 6 - Содержание дубильных веществ в сырье при различных условиях экстрагирования

Время экстрагирования, мин,	Размер частиц сырья, мм	Содержание дуб.веществ, Хср, %	Среднеквадратичное отклонение	P, %, t (p;f) =2,776	ΔX	E, %
30	Менее 0,25	5,694	0,062	95	0,077	1,35
	0,25-0,4	5,657	0,063	95	0,078	1,38
	0,4-1	5,185	0,072	95	0,089	1,72
	1-3	2,978	0,045	95	0,056	1,88
	3-4	1,986	0,021	95	0,026	1,31
	Более 4	1,628	0,011	95	0,014	0,84
40	Менее 0,25	5,711	0,064	95	0,079	1,39
	0,25-0,4	5,610	0,024	95	0,030	0,53
	0,4-1	2,640	0,033	95	0,041	1,55
	1-3	2,426	0,026	95	0,032	1,33
	3-4	3,107	0,013	95	0,016	0,52
	Более 4	2,061	0,014	95	0,017	0,84

Продолжение таблицы 6

50	Менее 0,25	5,000	0,059	95	0,073	1,46
	0,25-0,4	4,672	0,028	95	0,035	0,74
	0,4-1	3,557	0,016	95	0,020	0,56
	1-3	2,459	0,021	95	0,026	1,06
	3-4	2,034	0,019	95	0,026	1,16
	Более 4	1,704	0,008	95	0,010	0,58
60	Менее 0,25	5,008	0,047	95	0,058	1,17
	0,25-0,4	4,776	0,019	95	0,024	0,49
	0,4-1	3,969	0,024	95	0,030	0,75
	1-3	2,438	0,018	95	0,022	0,92
	3-4	2,119	0,014	95	0,017	0,82
	Более 4	1,800	0,011	95	0,014	0,76
24 часа (термос)	Менее 0,25	3,702	0,024	95	0,030	0,81
	0,25-0,4	3,107	0,013	95	0,016	0,52
	0,4-1	2,397	0,032	95	0,040	1,67
	1-3	2,331	0,013	95	0,016	0,69
	3-4	1,987	0,012	95	0,015	0,75
	Более 4	1,826	0,012	95	0,015	0,82

Для сравнения показателей, полученных в ходе эксперимента, был построен график зависимости содержания суммы дубильных веществ от измельченности сырья и времени экстрагирования (рисунок 14).

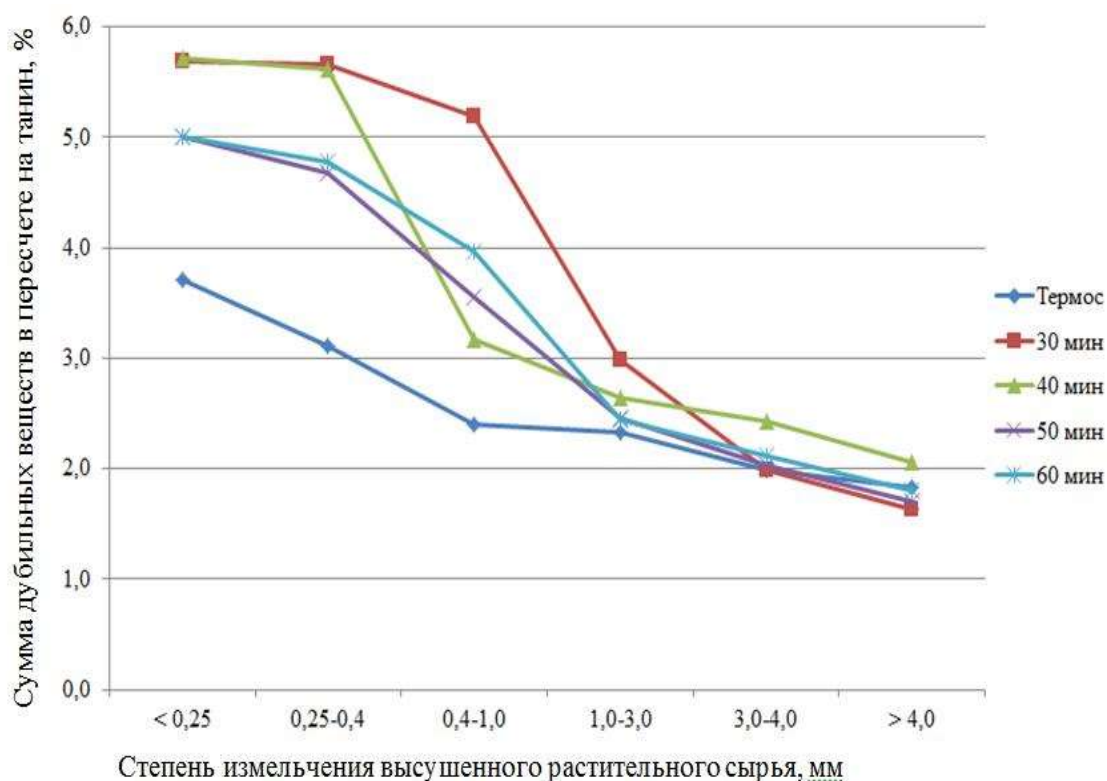


Рисунок 14. График влияния дисперсности высушенного растительного сырья, времени и способа экстрагирования на суммарное извлечение дубильных веществ траве золотарника канадского.

Максимальный выход дубильных веществ нами был отмечен при измельченности 1 мм и времени экстрагирования 30 минут. При использовании метода настаивания экстрагирование дубильных веществ происходит менее эффективно, чем при методике, описанной в ГФ.

По результатам отмечено, что экстрагирование дубильных веществ проходит менее эффективно независимо от способа экстрагирования и периода времени экстрагирования при размере частиц менее 1 мм.

В результате исследования нами подобраны оптимальные значения времени и способа экстрагирования, обеспечивающие максимальный выход дубильных веществ, а также степень измельчения частиц: время экстрагирования составляет 30 минут, способ – кипячение сырья на электрической плитке, размер сырья менее 1 мм.

Также нами было установлено содержание дубильных веществ в пересчете на галловую кислоту. На рисунке 15 показан спектр поглощения настоя до и после осаждения с 1% раствором коллагена.

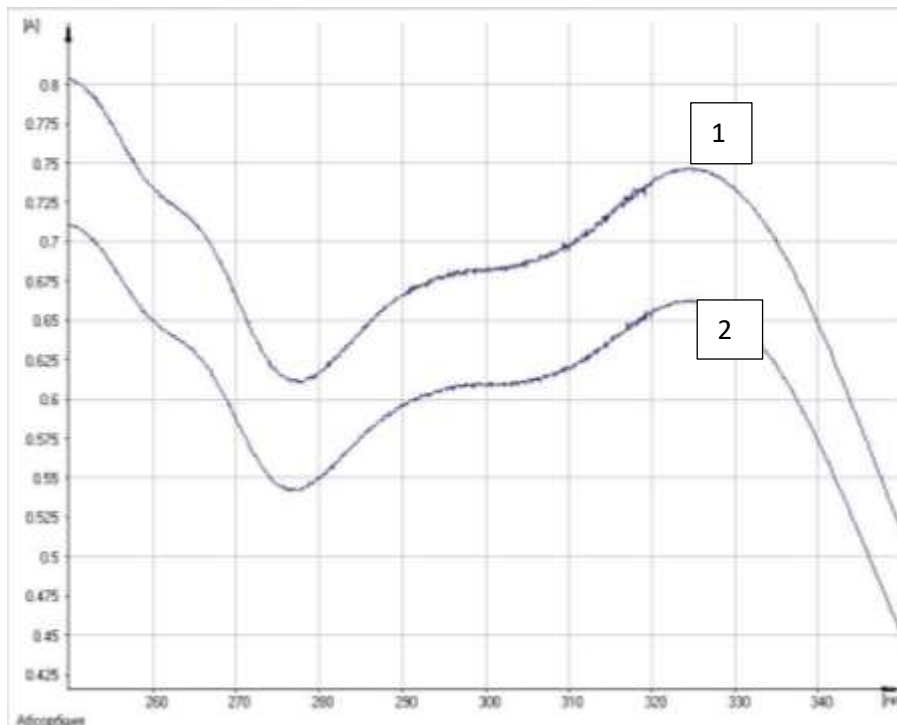


Рисунок 15. Спектр поглощения настоя при определении дубильных веществ в пересчете на галловую кислоту – 1 и после осаждения дубильных веществ раствором коллагена 1% - 2.

Таблица 7 - Характеристика методик количественного определения дубильных веществ в траве *S. canadensis* L.

Метод	<i>n</i>	<i>f</i>	x_{cp}	S^2	S	P, %	t (P,f)	Δx	Δx_{cp}	ε , %	RSD %
1. В пересчете на танин (титрование $KMnO_4$)	6	5	2,87	0,0059	0,0767	95	2,57	0,20	0,08	2,79	2,67
2. В пересчете на галловую кислоту (СФМ)	6	5	2,65	0,0065	0,0806	95	2,57	0,21	0,08	3,02	3,04
3. Сумма дубильных веществ, осаждаемых раствором коллагена 1%)	6	5	0,64	0,0008	0,0276	95	2,57	0,07	0,03	10,9	4,31

По данным эксперимента установлено, что содержание дубильных веществ в траве *S. canadensis* L. в пересчете на танин составляет $2,87 \pm 0,20$ %, на кислоту галловую $2,65 \pm 0,21$ %. Результаты исследования по обеим методикам сопоставимы в пределах ошибки.

4.2.2. Качественное и количественное определение содержания свободных органических кислот

Органические кислоты являются ценной группой БАВ, т.к. участвуют в энергетическом обмене организма, снижают рН среды. Некоторые из кислот обладают антиоксидантной и противовоспалительной активностью [21,47,91,93,96,102,103,118,122,124]. Поэтому нами проведены исследования по изучению содержания органических кислот в траве золотарника канадского.

Качественный и количественный анализ свободных органических кислот проводился методом ВЭЖХ (глава 2, раздел 2.3). На рисунке 16 представлена хроматограмма органических кислот. По полученным данным

выявлено содержание свободных органических кислот массой $426.5 \text{ мг} \pm 6.4 \text{ мг} / 100 \text{ г}$ (таблица 8).

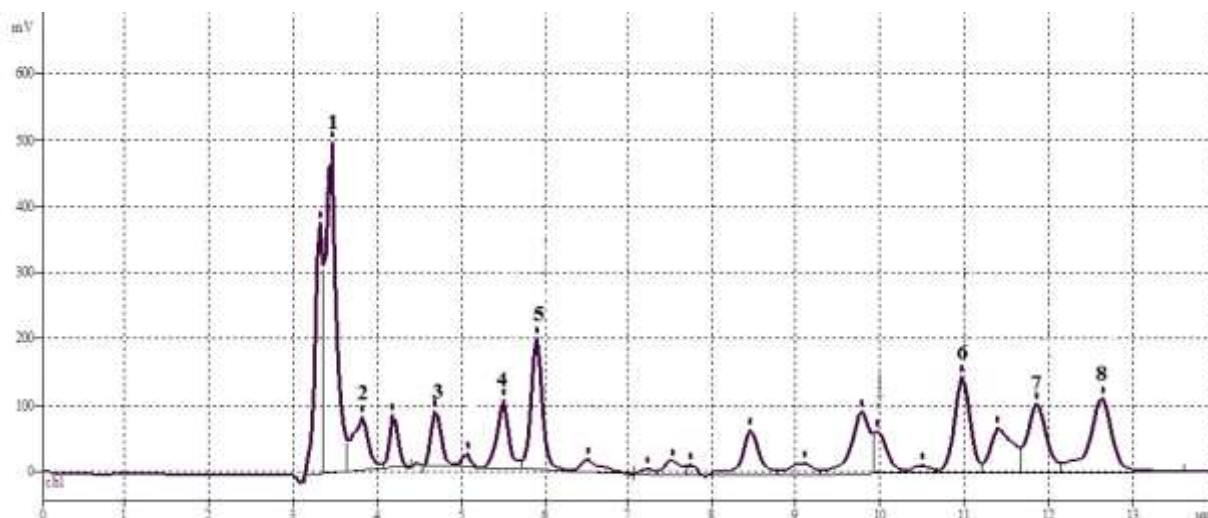
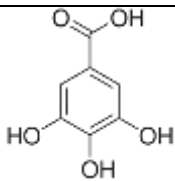
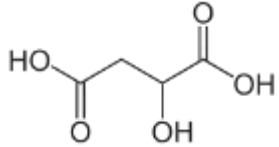
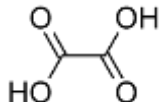
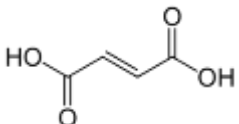


Рисунок 16. Хроматограмма ВЭЖХ - УФ травы *S. canadensis* L. по органическим кислотам: 1 - щавелевая кислота; 2 - винная кислота; 3 - яблочная кислота; 4 - аскорбиновая; 5 - галловая кислота; 6 - лимонная кислота; 7 - фумаровая кислота; 8 - янтарная кислота

Таблица 8 - Органические кислоты золотарника канадского

Наименование органической кислоты	Rt, tr	Содержание, мг /100 г (с пересчетом на сухое вещество)	Название по ИЮПАК	Структура
Аскорбиновая	5,486	$11,3 \pm 0,8$	(5R)-[(1S)-1,2-Dihydroxyethyl]-3,4-dihydroxyfuran-2(5H)-one	
Лимонная	10,960	$11,1 \pm 0,8$	2-Hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylic acid	
Винная	3,807	$6,3 \pm 0,3$	2,3-Dihydroxybutanedioic acid	
Янтарная	12,630	$66,7 \pm 2,5$	Butandioic acid	

Галловая	5,884	96,2±3,7	3,4,5-Trihydroxybenzoic acid	
Яблочная	4,861	36,2±3,9	2-Hydroxybutanedioic acid	
Щавелевая	3,430	200,1±5,4	Oxalic acid	
Фумаровая	11,850	5,0±1,1	(2E)-But-2-enedioic acid	

4.2.3. Качественное и количественное определение флавоноидов

Флавоноиды обладают антиоксидантной активностью [94,107].

Сравнительный анализ флавоноидов (в том числе гликозидов и агликонов) проводили в целях обоснования оптимального выбора исходного сырья для приготовления спирто-водных извлечений с последующим их использованием в лекарственной форме. Методом ВЭЖХ в листьях и цветках золотарника канадского были обнаружены: рутин, гиперозид, кверцетин. Кроме того, обнаружены дополнительно астрагалин, кверцитрин и изокверцитрин, кемпферол и изорамнетин (таблицы 9, 10, прил. 1-4).

Таблица 9 - Определение флавоновых гликозидов методом ВЭЖХ

Флавоноиды	цветки золотарника канадского		листья золотарника канадского	
	содержание в сырье, мг/г	время удерживания, мин	содержание в сырье, мг/г	время удерживания, мин
Рутин	6,87±0,30	8,141	1,93±0,10	8,168
Гиперозид	2,32±0,10	9,834	8,39±0,60	9,853
Изокверцитрин	3,53±0,20	10,322	3,32±0,20	10,338
Астрагалин	не обнаружено	-	0,72±0,06	12,469
Кверцитрин	7,73±0,40	15,549	8,85±0,50	13,561

Таблица 10 - Определение флавоновых агликонов методом ВЭЖХ

Флавоноиды	цветки золотарника канадского		листья золотарника канадского	
	содержание в сырье, мг/г	время удерживания, мин	содержание в сырье, мг/г	время удерживания, мин
Кверцетин	39,56±1,10	8,308	27,53±0,80	8,326
Кемпферол	1,71±0,08	14,068	2,65±0,10	14,118
Изорамнетин	0,61±0,08	15,529	1,14±0,08	15,596

Разработка методики качественного определения флавоноидов

Анализ качественного состава флавоноидов в сырье *S. canadensis* L. проводили методом ТСХ. Оптимальная система растворителей для подвижной фазы этилацетат : ледяная уксусная кислота : вода (7,5:1,5:1,5) [7].

Валидация методики проводилась по специфичности хроматографической системы – совпадение зон адсорбций извлечения и стандартов.

Приемлемость методики была оценена по совпадению зон адсорбций различных образцов сырья описанию методики.

Анализируя полученные хроматограммы извлечений и зон адсорбции веществ - свидетелей – растворов РСО гиперозида, хлорогеновой кислоты, рутина, кверцетина, кофейной кислоты, лютеолина установили, что в спиртовом извлечении и в траве золотарника присутствуют полифенольные соединения, по значению R_f соответствующие гиперозиду ($R_f=0,48$), хлорогеновой кислоте ($R_f=0,25$), рутину ($R_f=0,28$), кверцетину ($R_f=0,90$) Зоны хроматограмм со значением R_f около 0,01; 0,59; 0,66 и 0,70 не идентифицировали. Не обнаружены зоны адсорбции, соответствующие РСО кофейной кислоты и лютеолина (таблица 11, рисунок 17).

Таблица 11 - Результаты исследования полифенольных соединений водного и спирто-водного извлечения из травы золотарника канадского методом ТСХ

Исследуемый раствор	R _f пятен	Идентифицированные вещества	Неидентифициро- ванные вещества
Водное извлечение	0,48	гиперозид	0,01
	0,25	хлорогеновая кислота	0,59
	0,28	рутин	0,66
	0,90	кверцетин	0,70
Спирто-водное извлечение	0,48	гиперозид	0,01
	0,25	хлорогеновая кислота	0,59
	0,28	рутин	0,66
	0,90	кверцетин	0,70
PCO гиперозида	0,48		
PCO хлорогеновой кислоты	0,25		
PCO рутина	0,28		
PCO кверцетина	0,90		
PCO кофейной кислоты	0,85		
PCO лютеолина	0,87		

Спектр поглощения спирто-водного извлечения из травы золотарника канадского имеет максимум поглощения при длине волны 330 нм (рисунок 18), что по литературным данным свидетельствует о содержании флавоноидов. Спектр поглощения спирто-водного извлечения после реакции с алюминия хлоридом имеет максимум поглощения длине волны 410 нм, как и рутин после реакции с алюминия хлоридом (рисунки 19 - 20).

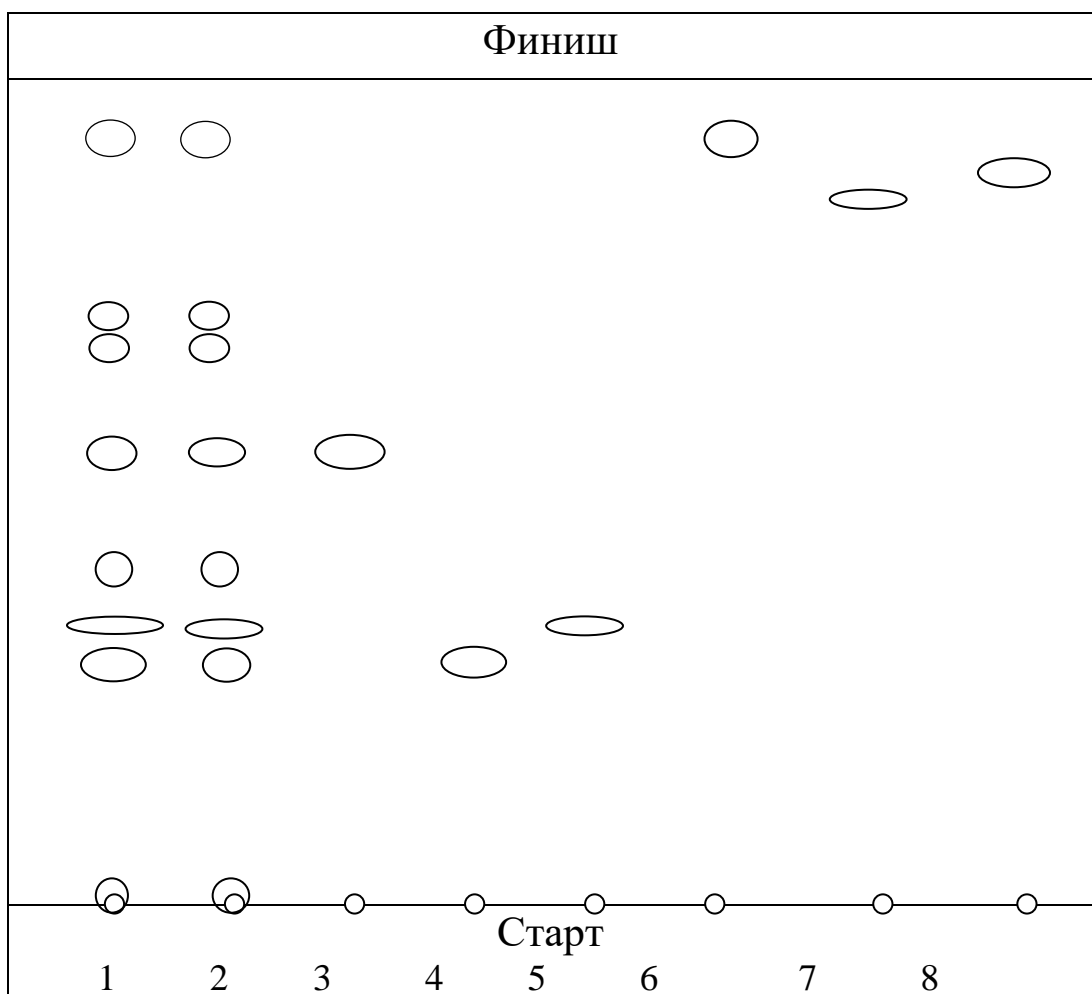


Рисунок 17. Хроматограмма определения веществ фенольной природы в траве золотарника канадского: 1 – Водное извлечение травы золотарника канадского, 2 – спирто-водное извлечение из травы золотарника канадского, 3 – РСО гиперозида, 4 – РСО хлорогеновой кислоты, 5 – РСО рутина, 6 – РСО кверцетина, 7 – РСО кофейной кислоты, 8 – РСО лутеолина

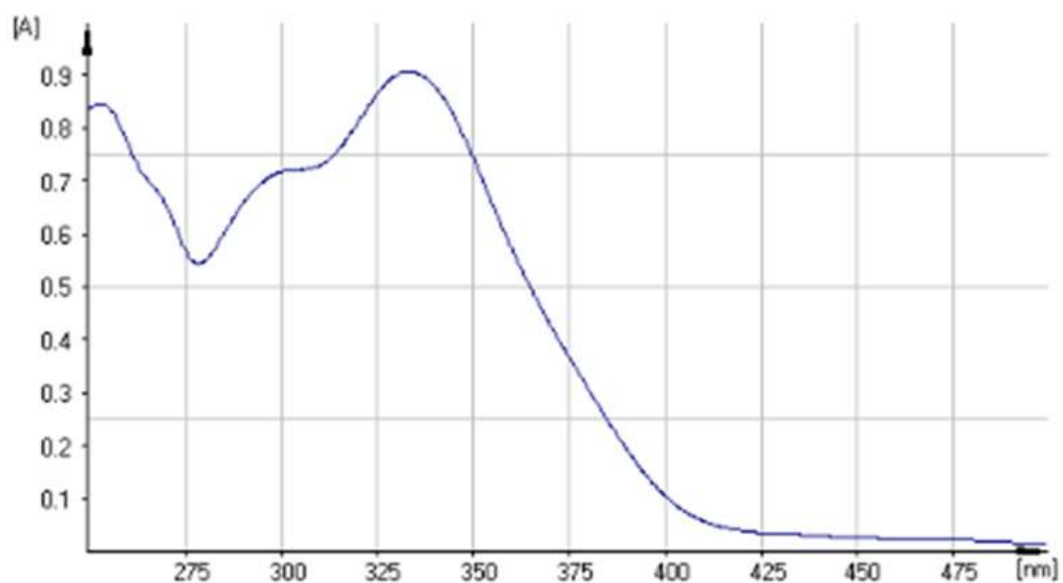


Рисунок 18. Спектр спирто-водного извлечения травы золотарника канадского.

В ходе эксперимента нами изучены условия экстракции флавоноидов в зависимости от экстрагента, степени измельченности, времени экстрагирования, соотношения сырья и экстрагента.

При выборе оптимальной концентрации экстрагента использовали этанол следующих концентраций: 50%, 60%, 70%, 80%, 96%. Наибольший выход наблюдается при концентрации этанола 80%. Результаты исследований в таблице 12.

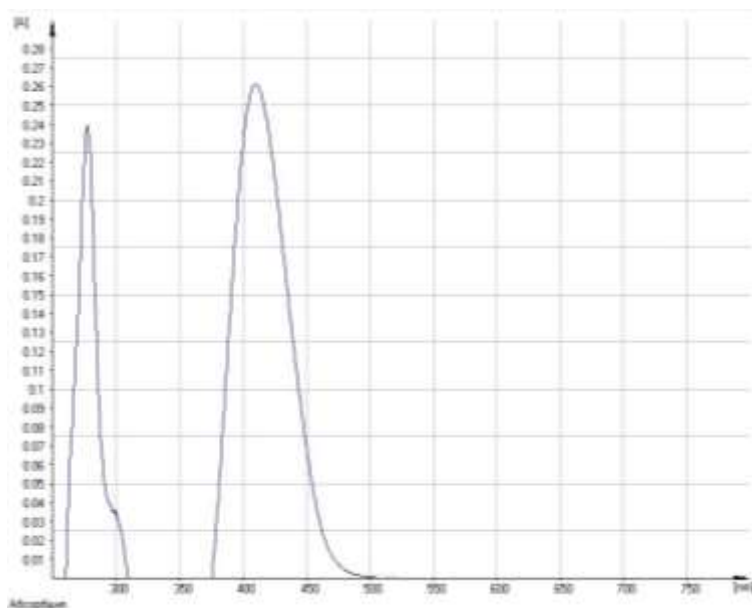


Рисунок 19. Спектр поглощения спирто-водного извлечения после реакции с алюминия хлоридом.

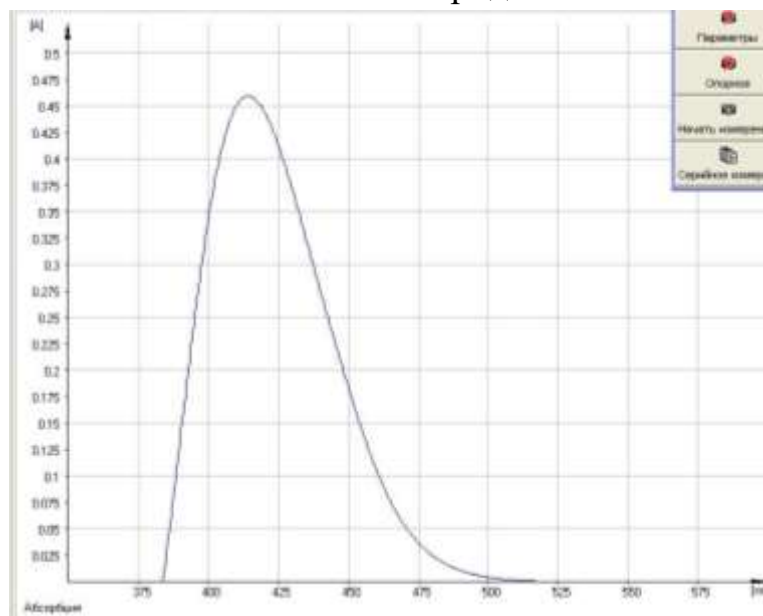


Рисунок 20. Спектр поглощения рутина после реакции с алюминия хлоридом.

Таблица 12 – Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в траве золотарнике канадского.

Концентрация спирта, %	50	60	70	80	96
Содержание флавоноидов, в пересчете на рутин, %	1,115±0,102	3,473±0,103	3,721±0,009	4,068±0,012	3,798±0,029

При определении оптимальной степени дисперности сырья травы золотарника канадского измельчали, просеивали через сита, брали навески с размером частиц менее 0,25 мм, 0,25-0,4 мм, 0,4-1 мм, 1-3 мм, 3-4 мм, более 4 мм. Далее использовали методику, описанную выше. Результаты исследований представлены в таблице 13.

Наибольший выход было обнаружено, что наибольший выход суммы флавоноидов при размере сырья менее 0,25 мм. Оптимальным размером сырья травы золотарника для определения суммы флавоноидов является 1 мм.

Таблица 13 - Содержание флавоноидов в траве золотарника канадского в зависимости от дисперности сырья

Размер частиц, мм	<0,25	0,25-0,4	0,4-1	1-3	3-4
Содержание флавоноидов, %	7,474±0,029	6,833±0,019	6,249±0,033	3,007±0,018	0,634±0,014

Для установления максимума достижения окраски испытуемого раствора и его стабильности были проанализированы растворы после добавления комплексообразователя в течение 1 часа. Установлено, что максимум оптической плотности достигается через 25 минут и сохраняется в течение наблюдаемого периода (рисунок 21).

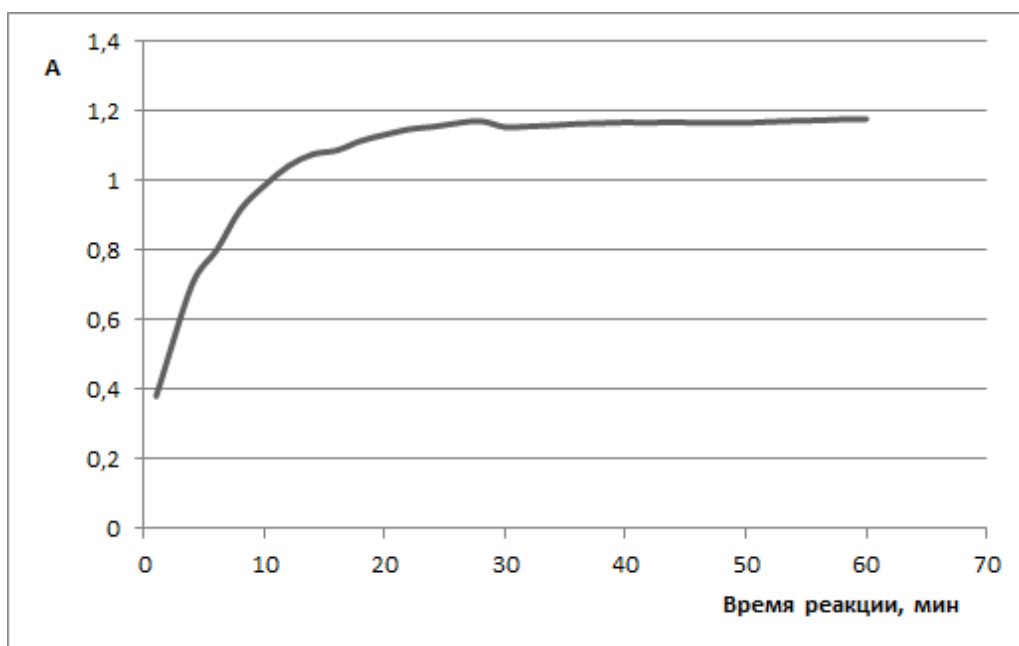


Рисунок 21. Зависимость оптической плотности извлечения с комплексообразователем от времени реакции

Согласно экспериментальным данным, для получения наиболее стабильных результатов, оптимальным является использование в качестве комплексообразующего реагента 2% спиртового раствора алюминия хлорида в соотношении экстракт-комплексообразователь 1:2 (рисунок 22).

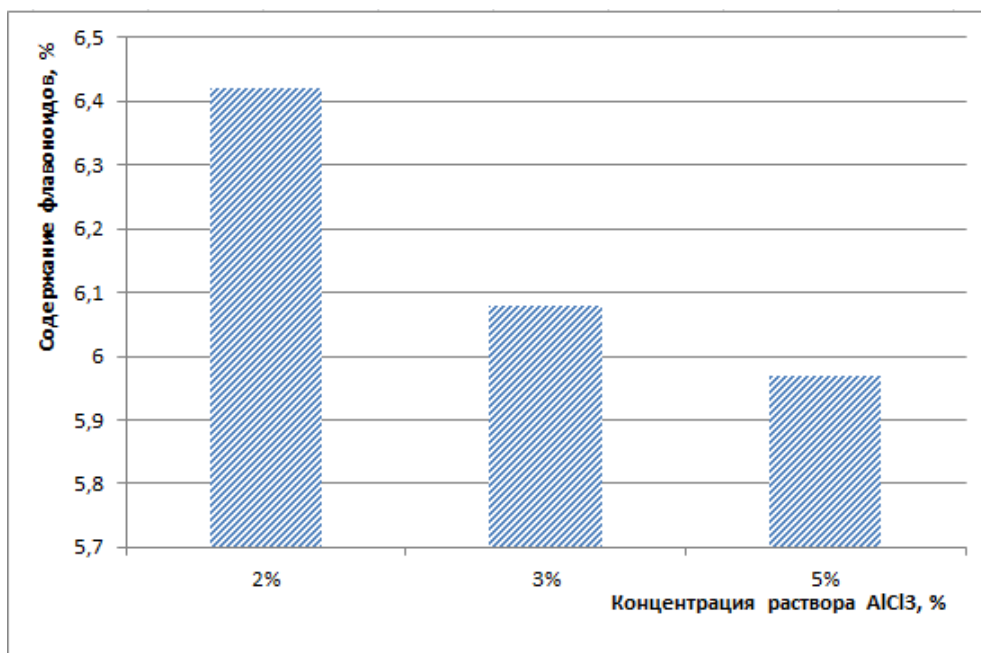


Рисунок 22. Влияние концентрации комплексообразователя на результаты определения флавоноидов в извлечении.

Для того чтобы предлагаемая методика заняла достойное место при определении качества травы золотарника канадского была проведена ее валидация. Валидация проводилась в диапазоне значений оптической плотности от 0,2 до 0,9 при длине волны 410 ± 2 нм.

Линейность определяли на 5 экспериментальных точках (уровнях концентраций). Растворы готовили путем увеличения аликвотной доли по описанной выше методике. Аликвотные доли были равны 0,8; 1,0; 1,5; 2,0; 2,5 мл соответственно (таблица 14). На рисунке 23 представлена зависимость значения оптической плотности полученных извлечений от содержания флавоноидов в навеске сырья. Коэффициент корреляции, являющийся критерием приемлемости линейности, составил 0,9968, что близко к 1 и свидетельствует о линейной зависимости значения оптической плотности от содержания действующих веществ.

Таблица 14 - Результаты определения линейности методики

№ образца	Аликвотная доля, мл	Оптическая плотность, А
1	0,8	0,2058
2	1,0	0,3560
3	1,5	0,4836
4	2,0	0,6284
5	2,5	0,8064

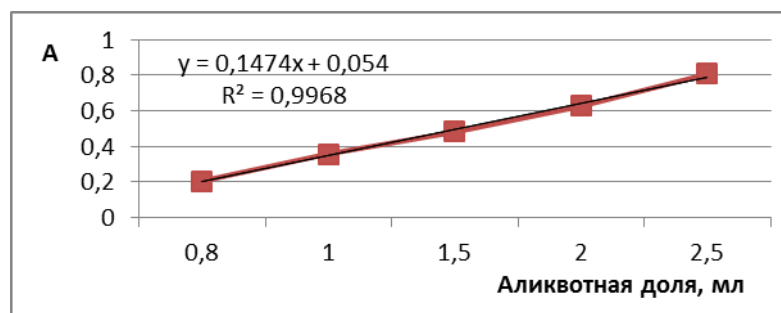


Рисунок 23. Результаты определения линейности методики

При установлении *повторяемости* проводили 6 параллельных определений, затем вычисляли величину стандартного отклонения (S) и относительного стандартного отклонения (S отн) (таблица 15).

Относительное стандартное отклонение составило 2,43% (не более 10%), что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости.

Таблица 15 - Результаты оценки повторяемости методики

№ образца			1	2	3	4	5	6
Содержание флавоноидов, %			4,06	4,22	4,31	4,07	4,17	4,07
f	X_{cp}	S^2	S	ΔX	ΔX_{cp}	t(95%,5)	$\varepsilon_{cp},\%$	RSD,%
5	4,15	0,01	0,1018	0,26	0,11	2,57	2,65	2,45

Воспроизводимость определяли 2 аналитика на 3 образцах в 3 повторностях. Из результатов следует, критерии приемлемости не превышены (не более 5%), что указывает на ее удовлетворительную воспроизводимость (таблица 16).

Таблица 16 - Результаты оценки воспроизводимости методики

№	Аналитик 1 Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %			Статистические характеристики	Аналитик 2 Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %			Статистические характеристики
	образцы				образцы			
	1	2	3		1	2	3	
1	4,07	4,08	4,06	$X_{cp} = 4,12$ $X_{min} = 4,06$ $X_{max} = 4,21$ $S = 0,058$ $S^2 = 0,0034$ RSD = 1,41 % ДИ(p=95%)= 4,12±0,04	4,09	4,16	4,13	$X_{cp} = 4,13$ $X_{min} = 4,05$ $X_{max} = 4,18$ $S = 0,040$ $S^2 = 0,0016$ RSD = 0,98 % ДИ(p=95%)= 4,13±0,03
2	4,08	4,18	4,21		4,11	4,15	4,18	
3	4,06	4,13	4,17		4,05	4,13	4,16	
F(5%;8;8) = 3,44; t(5%;16)=2,12					F _{пр} = 0,33; t _{пр} = 0,35			

Правильность оценивали путем добавления к исследуемому извлечению известного количества РСО рутин с использованием 9 определений на 3 концентрациях, охватывающих требуемый диапазон. Из приведенных данных (таблица 17) следует, что относительное стандартное отклонение не превышает 5 %, что является свидетельством отсутствия систематической ошибки усовершенствованной нами методики.

Таблица 17 - Результаты подтверждения правильности методики

№ образца	Содержание суммы флавоноидов в пробе, г	Добавлено СО рутина, г	Содержание		Открываемость, %
			ожидаемое, г	полученное, г	
1	0.0430	0.0100	0.0530	0.0519	97.92
	0.0430	0.0200	0.0630	0.0635	100.79
	0.0430	0.0300	0.0730	0.0711	97.40
2	0.0584	0.0100	0.0684	0.0657	96.05
	0.0584	0.0200	0.0784	0.0817	104.21
	0.0584	0.0300	0.0884	0.0855	96.72
3	0.0487	0.0100	0.0587	0.0568	96.76
	0.0487	0.0200	0.0687	0.0710	103.35
	0.0487	0.0300	0.0787	0.0805	102.29
Метрологическая характеристика: $X_{cp} = 99.50\%$. $RSD = 3.16\%$					

Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в траве *Solidago canadensis L.* Установлены оптимальные параметры экстракции: сырье диаметром частиц не более 1 мм, экстрагент 80% спирто-водный раствор этанола, концентрация комплексообразователя хлорида алюминия 2%. Разработанная методика валидирована по показателям: линейность, повторяемость, воспроизводимость, правильность, из чего следует, что предлагаемая методика является высокочувствительной, правильной и воспроизводимой.

4.2.5. Качественное и количественное определение гидроксикоричных кислот

Гидроксикоричные кислоты также являются биологически активными веществами, проявляющими антиоксидантную активность, которые играют ключевую роль в терапии воспалительных заболеваний пародонта [37,105,108,111,117,121,125,127,133]. Качественный анализ свободных гидроксикоричных кислот проводился методом ВЭЖХ (глава 2, раздел 2.3), результаты представлены на рисунке 24 [84].

Количественный анализ гидроксикоричных кислот проводился методом ВЭЖХ и СФМ. По последнему методу была проведена валидация методики по хлорогеновой кислоте. В таблице 18 приведены результаты количественного анализа гидроксикоричных кислот. По полученным данным выявлено содержание суммы гидроксикоричных кислот $1.16 \text{ г} \pm 10.7 \text{ мг/100 г}$. Спектр спирто-водного извлечения травы золотарника канадского показан на рисунке 19 [69].

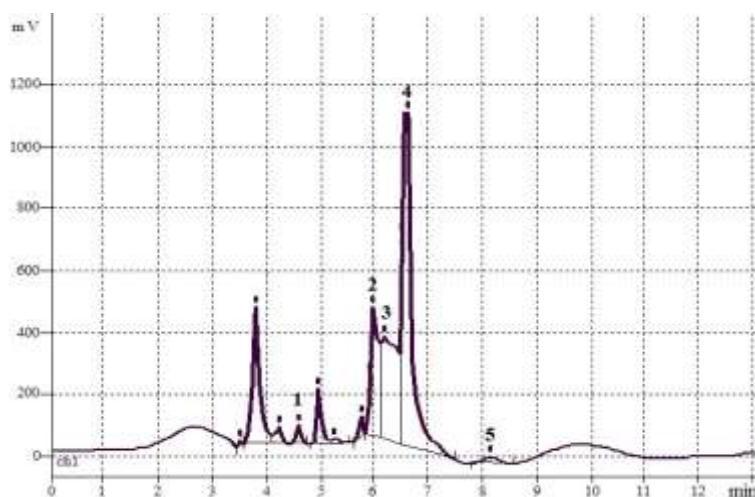
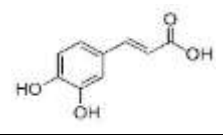
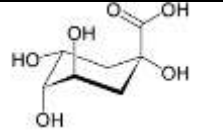
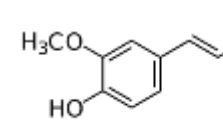


Рисунок 24. Хроматограмма ВЭЖХ - УФ травы *S. canadensis* L. по гидроксикоричным кислотам: 1 – хинная; 2 - цикориевая; 3 - хлорогеновая; 4 - кофейная; 5 - феруловая.

Таблица 18 - Гидроксикоричные кислоты золотарника канадского

Наименование органической кислоты	Время удерживания, t_R	Содержание, мг /100 г (с пересчетом на сухое вещество)	Название по ИЮПАК	Структура
Цикориевая	5,948	240,0±6,3	(2R,3R)-2,3-bis{[(E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxy}butanedioic acid	
Хлорогеновая	6,175	320,2±5,4	(1S,3R,4R,5R)-3-{[(2E)-3-(3,4-dihydroxyphenyl)prop-2-enoyl]oxy}-1,4,5-trihydroxycyclohexanecarboxylic acid	

Кофейная	6,567	600,1±12,3	3-(3,4-Dihydroxyphenyl)-2-propenoic acid	
Хинная	4,554	80,7±4,7	(1S,3R,4S,5R)-1,3,4,5-tetrahydroxycyclohexanecarboxylic acid	
Феруловая	8,113	4,3±0,7	(E)-3-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)prop-2-enoic acid	

При разработке методики количественного определения гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую была использована трава золотарника канадского, собранная в Московской области в фазу цветения и плодоношения в 2017 году [69].

На рисунке 19, виден максимум поглощения при длине волны 327 нм, что соответствует хлорогеновой кислоте. Также по результатам ТСХ извлечений из травы золотарника канадского отмечено равное значение Rf пятна извлечения травы золотарника и Rf СО хлорогеновой кислоты. В связи с этим проведены исследования по разработке методики количественного определения гидроксикоричных кислот в траве золотарника канадского в пересчете на хлорогеновую методом СФМ [69].

Для определения оптимальных условий извлечений гидроксикоричных кислот изучены влияния различных условий: концентрация экстрагента, степени измельченности, времени экстрагирования, соотношения сырья и экстрагента [69].

При определении экстрагента, который обеспечивает наибольший выход гидроксикоричных кислот исследовали спирто-водные извлечения, полученные при помощи 60%, 70% и 80% растворов этанола [69].

Наибольший выход гидроксикоричных кислот нам отмечен при использовании спирта этилового 70% (таблица 19) [69].

Таблица 19 - Выход гидроксикоричных кислот в зависимости от экстрагента

Концентрация спирта, %	50	60	70	80	96
Содержание ГКК, в пересчете на хлорогеновую, %	3,85±0,27	4,34±0,27	4,63±0,27	3,38±0,27	2,97±0,27

При определении оптимальной степени дисперности сырья травы золотарника канадского измельчали, просеивали через сита, брали навески с размером частиц менее 1 мм, 1 мм, 3 мм, 4 мм. Далее использовали методику, писанную выше. Результаты исследований представлены в таблице 20.

Наибольший выход было обнаружено, что наибольший выход гидроксикоричных кислот при размере сырья менее 1 мм [69].

Таблица 20 - Выход гидроксикоричных кислот в зависимости при различной измельченности сырья травы золотарника канадского

Размер частиц, мм	<1	1	3	4
Содержание гидроксикоричных кислот, %	7,03±0,41	5,41±0,38	3,33±0,24	2,52±0,15

Результаты исследований по определению оптимальных условий влияния времени и количеств экстракций на выход гидроксикоричных кислот отражены в таблице 21. Наибольшая экстракция гидроксикоричных кислот в траве золотарника канадского наблюдалась при двухкратной экстракции по 15 минут [69].

При исследовании влияния оптимального соотношения сырья и экстрагента на выход гидроксикоричных кислот использовали следующие соотношения: 1:25, 1:50, 1:100, 1:250. Результаты исследования на выход гидроксикоричных кислот в зависимости от соотношения сырья представлены в таблице 22 [69].

Таблица 21 - Выход гидроксикоричных кислот при изменениях условий экстрагирования

№ опыта	Количество экстракций	Время одного экстрагирования, мин	Содержание гидроксикоричных кислот, %
1	1	15	4,69±0,19
2	2	15	5,56±0,26
3	3	15	3,68±0,17
4	1	30	5,31±0,19
5	1	45	4,24±0,16
6	1	60	4,18±0,17

Таблица 22 - Влияние соотношения сырья и экстрагента на выход гидроксикоричных кислот

Соотношение	Содержание гидроксикоричных кислот, %
1:25	4,05 ± 0,11
1:50	3,29 ± 0,05
1:100	3,39 ± 0,02
1:250	4,71 ± 0,17

Валидация методики проводилась в диапазоне значений оптической плотности от 0,2 до 0,9. Для проверки **линейности** брали 5 экспериментальных точек аликвотной доли: 0,50; 0,75; 1,00; 1,50; 2,00 определяли оптическую плотность растворов (таблица 23) [69].

На рисунке 25 представлен график линейности методики. Коэффициент корреляции, который является критерием линейности, составил 0,9786, что говорит о линейной зависимости значения оптической плотности от содержания действующих веществ [69].

Таблица 23 - Результаты определения линейности методики

№ образца	Аликвотная доля, мл	Оптическая плотность, А
1	0,60	0,2434±0,013
2	0,75	0,3455±0,027
3	1,00	0,4842±0,036
4	1,50	0,6733±0,033
5	1,75	0,7971±0,046

Повторяемость методики определяли с 6 параллельных исследованиями. Относительное стандартное отклонение составило 1,28 (не более 10%), что свидетельствует о прецизионности методики в условиях повторяемости (таблица 24) [69].

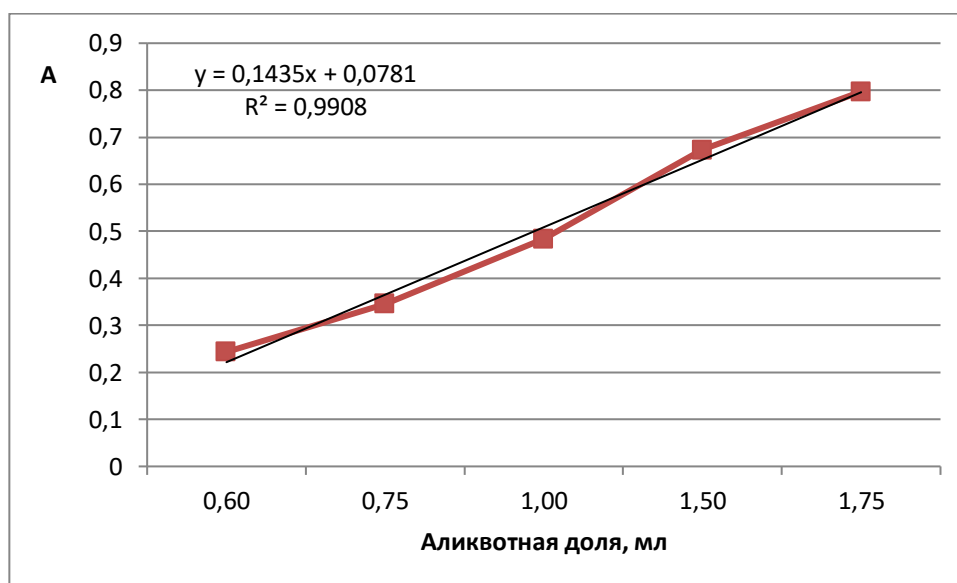


Рисунок 25. Линейность методики определения гидроксикоричных кислот в траве золотарника канадского

Таблица 24 - Результаты оценки повторяемости методики

№ образца			1	2	3	4	5	6
Содержание ГКК, %			4,73	4,66	4,69	4,78	4,85	4,53
f	X_{cp}	S^2	S	ΔX	ΔX_{cp}	t(99%,5)	$\epsilon, \%$	RSD, %
5	4,71	0,0036	0,0601	0,28	0,11	4,03	5,01	1,28

Воспроизводимость определяли 2 аналитика при 6 повторностях. Результаты определения внутрилабораторной воспроизводимости методики представлены в таблице 25. При определении результатов содержания ГКК вычисленное значение критерия Фишера $F_{пр} = 0,63$, что не превышает табличное значение (5,05). Значит, различие дисперсий статистически незначимо. Величина критерия Стьюдента $t_{пр} = 0,13$, что также не превышает табличное значение (2,228). На основании этого можно сделать вывод об отсутствии статистически значимых различий между результатами анализов, различия между стандартными отклонениями случайны. Таким образом, при определении прецизионности установлена сходимость и промежуточная прецизионность результатов определения по предложенной методике [69].

Таблица 25 - Результаты оценки воспроизводимости методики

№	Аналитик 1 Содержание суммы ГКК, %	Статистические характеристики	Аналитик 2 Содержание суммы ГКК, %	Статистические характеристики
1	4,29	$X_{cp} = 4,32$	4,37	$X_{cp} = 4,22$
2	4,37	$X_{min} = 4,21$	4,13	$X_{min} = 4,13$
3	4,41	$X_{max} = 4,41$	4,14	$X_{max} = 4,37$
4	4,33	$S = 0,071$	4,23	$S = 0,089$
5	4,28	$S^2 = 0,005$	4,25	$S^2 = 0,008$
6	4,21	$RSD = 1,64\%$ $ДИ(p=95\%) = 4,32 \pm 0,07$	4,18	$RSD = 2,21\%$ $ДИ(p=95\%) = 4,22 \pm 0,09$
$F(5\%;5;5) = 5,05; t(5\%;10) = 2,228$			$F_{пр} = 0,63; t_{пр} = 0,13$	

Правильность методики была оценена путем добавления к исследуемым извлечениям стандартного раствора кислоты хлорогеновой с использованием 9 определений и трех концентраций с охватом требуемого диапазона (таблица 26) [69].

Таблица 26 - Результаты определения правильности методики методом добавок

№ образца	Содержание суммы гидроксикоричных кислот в пробе, г	Добавлено РСО хлорогеновой кислоты, мг	Содержание, г		Открываемость, %
			ожидаемое	полученное	
1	0,041	0,014	0,055	0,058	104,55
	0,082	0,014	0,096	0,094	97,80
	0,123	0,014	0,137	0,136	99,06
2	0,033	0,014	0,047	0,045	95,51
	0,067	0,014	0,081	0,083	100,28
	0,099	0,014	0,113	0,116	102,96
3	0,034	0,014	0,048	0,049	101,07
	0,068	0,014	0,082	0,080	98,14
	0,102	0,014	0,116	0,112	96,80
Метрологические характеристики: $X_{ср} = 99,57\%$, $RSD = 2,94\%$					

По результатам установления линейности, правильности и прецизионности валидированная методика количественного определения суммы ГКК методом СФМ при 330 ± 2 нм в диапазоне значений оптической плотности от 0,2 до 0,9 может применяться для определения суммы ГКК в пересчете на хлорогеновую кислоту в траве золотарника канадского [69].

4.2.6. Качественное и количественное определение полисахаридов

Качественное содержание полисахаридов было подтверждено качественными реакциями (глава 2).

Количественное содержание полисахаридов в траве золотарника канадского проводилось методом спектрофотометрии и методом гравиметрии. Методика исследований описана в главе 2. В полученных результатах было отмечено, что при подсчете содержания полисахаридов методом гравиметрии в траве золотарника канадского их сумма составляет 4,32%, методом спектрофотометрии – 5,20% (таблица 27). Расчет суммы полисахаридов при использовании спектрофотометрической методики

пересчитывали на глюкозу. По литературным данным золотарник канадский содержит в своем составе арабинозу, галактозу, глюкозу.

Полученные результаты определения полисахаридов отличаются значимо ($4,32 \pm 0,21\%$; $5,20 \pm 0,27\%$). Данное расхождение объясняется тем, что методом гравиметрии определяется сумма связанных полисахаридов, метод СФМ определяет сумму свободных и связанных полисахаридов.

Таблица 27 - Метрологические характеристики методик количественного определения полисахаридов

Метод	n	f	$x_{\text{ср}}$	S^2	S	P , %	t (P, f)	Δx	$\Delta x_{\text{ср}}$	ε , %	RSD, %
1. Гравиметрия	6	5	4,32	0,0070	0,0835	95	2,57	0,21	0,09	4,95	1,93
2. СФМ	6	5	5,20	0,0111	0,1052	95	2,57	0,27	0,11	5,19	2,02

4.2.7. Качественное и количественное определение минеральных веществ

Впервые выполнен качественный и количественный анализ элементного состава травы золотарника канадского и травы золотарника карликового. Данные исследования элементного состава были методом проведены методом энергодисперсионного рентгенофлуоресцентного анализа (РФА-ЭД) с целью оценки их экологической чистоты и перспективности использования в медицинской практике. Результаты представлены в таблицах 28-30 [68].

Таблица 28 - Содержание макроэлементов в пересчете на сухое вещество

Образец и место сбора	Содержание элемента, мг/г			
	Ca	K	P	S
Золотарник канадский (Ростовская область, расфасованное, серия 18.08.2016)	23,1	37,7	4,8	1,1

Золотарник канадский (Тульская область, Алексинский район)	80,0	178,1	29,2	11,8
Золотарник канадский (Тульская область, Ленинский район)	77,1	138,5	31,7	10,2
Золотарник канадский (Москва, район Орехово-Борисово Южное)	53,9	148,1	23,1	5,1
Золотарник канадский (Тверская область)	65,4	161,3	26,1	7,2
Золотарник канадский (Наро-Фоминск)	37,1	90,3	15,2	4,0
Золотарник карликовый (Тверская область)	63,6	110,1	15,2	3,9

Таблица 29 - Содержания микроэлементов в пересчете на сухое вещество

Образец и место сбора	Содержание элемента, мкг/г								мг/г	
	Mo	Zr	Sr	Rb	Pb	Zn	Cu	Mn	Fe	Si
Золотарник канадский (Ростовская область, расфасованное, серия 18.08.2016)	1,2	0,9	84,4	14,6	*	33,6	*	35,7	0,6	3,7
Золотарник канадский (Тульская область, Алексинский район)	10,6	6,3	160,7	212,9	21,6	416,0	120,3	171,8	4,2	10,4
Золотарник канадский (Тульская область, Ленинский район)	6,2	4,6	143,1	33,2	9,2	210,5	40,4	234,0	1,5	9,2

Продолжение таблицы 29

Золотарник канадский (Москва, район Орехово-Борисово Южное)	5,8	9,6	113,5	32,1	9,6	310,4	40,4	*	3,2	8,3
Золотарник канадский (Тверская область)	8,7	2,2	112,5	184,6	*	290,5	31,0	512,8	1,1	7,8
Золотарник канадский (Наро-Фоминск)	7,0	1,7	37,7	10,8	2,0	147,9	11,8	70,8	0,3	3,7
Золотарник карликовый (Тверская область)	9,3	1,5	101,3	137,4	*	144,8	*	460,8	1,5	6,4

*-содержание элемента ниже предела обнаружения

Таблица 30 - Содержание ультрамикрэлементов в пересчете на сухое вещество

Образец и место сбора	Содержание элемента, мкг/г	
	Cr	Ti
Золотарник канадский (Ростовская область, расфасованное, серия 18.08.2016)	7,9	43,2
Золотарник канадский (Тульская область, Алексинский район)	*	249,0
Золотарник канадский (Тульская область, Ленинский район)	20,4	148,7
Золотарник канадский (Москва, район Орехово-Борисово Южное)	34,6	231,5
Золотарник канадский (Тверская область)	18,3	96,5
Золотарник канадский (Наро-Фоминск)	12,8	58,0
Золотарник карликовый (Тверская область)	*	63,6

*-содержание элемента ниже предела обнаружения

Содержание элементов Sb, Sn, Cd, Ag, Bi, As, Se, Hg, W, Ni, Co, V, Ba, Mg во всех образцах ниже пределов обнаружения.

Как следует из полученных данных, трава золотарника канадского богата макро- и микроэлементами, из которых 8 эссенциальных элементов (Ca, P, K, Zn, Mn, Mo, S, Cu) и 2 условно-эссенциальных (Sr, Cr). Содержание элементов Sb, Sn, Cd, Ag, Bi, As, Se, Hg, W, Ni, Co, V, Ba, Mg ниже предела обнаружения. Метод РФА-ЭД позволяет определить в траве золотарника канадского 16 химических элементов [68].

Следует отметить значительное расхождение концентрации макроэлементов у фасованной серии, в которой содержание кальция, калия, фосфора и серы снижено в 2 – 10 раз по сравнению с сырьем, собранным в виде нативных образцов, не подвергавшихся технологической обработке, в частности, измельчению в промышленных установках [68].

Для нативного сырья следует отметить существенный разброс содержания калия. Минимальное значение отмечено для травы золотарника канадского, собранной в Наро-Фоминском районе Московской области (90,3 мг/г) и максимальное для травы золотарника канадского, собранного в Тульской области (178,1 мг/г) [68].

Содержание фосфора и серы колеблется в пределах 15,2-31,7 мг/г и 3,9-11,8 мг/г, соответственно [68].

Анализируя данные разброса величин с точки зрения места произрастания, не удастся отметить корреляции данных показателей с антропогенным воздействием. Так, трава золотарника канадского, собранный в Москве у паркинга имеет средние величины по макроэлементам в сравнении со всеми остальными, собранными вне городской зоны (лес, луг, проселочные дороги). При этом содержание калия в траве золотарника канадского из Тверской области практически вдвое превышает содержание данного элемента в траве золотарника канадского, собранного в городской зоне. Анализируя видовое отличие золотарника канадского и золотарника карликового, не удастся отметить избирательного накопления макроэлементов между видами [68].

Сравнение содержания микроэлементов с тех же позиций выявляет тенденцию значительно меньшего содержания микроэлементов в фасованном сырье по сравнению с нативным сырьем. Не удается отметить межвидовой корреляции содержания микроэлементов в золотарнике канадском и золотарнике карликовом.

Значительное содержание микроэлементов отмечается для таких элементов как марганец, содержание которого колеблется от нижнего предела обнаружения до 12,8 мкг/г для золотарника канадского, собранного возле паркинга и Тверской области, соответственно, а также цинк от 144,8 мкг/г для золотарника карликового из Тверской области и 416,0 мкг/г для золотарника канадского из Тульской области.

Отмечается также значимое содержание стронция от 37,7 мкг/г в золотарнике канадском Наро-Фоминского района и 160,0 мкг/г в золотарнике канадском Тульской области; рубидия от 10,8 мкг/г в золотарнике канадском Наро-Фоминского района и 212,9 мкг/г в золотарнике канадском Тульской области.

Содержание токсичных элементов, нормируемых СанПин 2.3.2.1078-01, в данном случае свинца, превышено для золотарника канадского из Тульской области и паркинга Москвы.

Таким образом, отмечено значимое содержание всего комплекса микроэлементов для золотарника из Тульской области (лес, луг) и Тверской области. Превышение концентрации свинца в 1,5 раза для сырья, отобранного в черте города может быть следствием наличия свинца в выхлопных газах, а для сырья из Тульской области возможно общее экологическое превышение за счет крупного металлургического производства, действующего в течение длительного периода времени, что может быть характерно и для Тверской области, отличающейся значительным содержанием микроэлементов. Подтверждением высказанному предположению может служить и содержание ультрамикроэлементов, содержание которых также выделяется в сырье из

Тульской области и Москвы (паркинг): отмечено содержание титана в диапазоне от 148,7 до 249,0 мкг/г.

Анализ других элементов, в том числе и достоверно токсичных (As, Cd, Hg) во всех анализируемых образцах ниже предела обнаружения.

Таким образом общий анализ элементного состава показывает, что изучаемое сырье обладает значительной концентрацией таких микроэлементов, как Mn; Zn; Sr; Rb; Ti, Mo, Cu [68].

Марганец накапливается во многих растениях, играя важную роль в процессах углеводного, белкового и фосфорного обмена. Данные процессы регулируют такие ферменты, как карбоксилаза, аминопептидаза, галактотрансфераза, аргиназа, щелочная фосфатаза, активируемые ионами марганца. Цинк, кобальт и марганец участвуют в процессах кроветворения [45,58,59]. Молибден является активатором таких ферментов как альдегиддегидрогеназа, сульфитоксидаза, нитратредуктаза и ксантинредуктаза. Известно, что молибден задерживает фтор в организме, что препятствует развитию кариеса зубов [51,58,59]. Кофактором ферментов цитохромоксидазы, полифенол-, ди-, amino- и аскорбиноксидазы является медь. В растениях также накапливается стабильный изотоп стронция, который препятствует процессам остеопороза и развитию кариеса, поскольку влияет на обмен кальция. Накопление молибдена, стронция и меди может способствовать улучшению антиоксидантных свойств травы золотарника и оказывать благотворное влияние на состояние полости рта.

4.3. Разработка показателей качества сырья золотарника канадского для изготовления спирто-водных извлечений

4.3.1. Определение числовых показателей сырья

Для оценки качества и стандартизации сырья золотарника канадского, а также для его использования в приготовлении спирто-водных извлечений, были определены числовые показатели. Числовые показатели (влажность, зола общая, зола, нерастворимая в 10 % хлористоводородной кислоте,

содержание примесей и экстрактивных веществ) были проведены согласно методикам, описанными в ГФ РФ XIV, издании (глава 2).

При экстрагировании растительного сырья должны учитываться технологические параметры сырья и гидродинамические условия экстрагирования.

Ниже приведены технологические параметры сырья, которые были рассчитаны при выполнении методик, описанных выше (глава 2, раздел 2.5) (таблицы 31-32).

Таблица 31 - Технологические параметры травы золотарника канадского

№ п/п	Показатель	Полученные значения
1	Удельная масса (d_y)	1,42±0,04
2.	Насыпная масса (d_n)	0,12±0,02
3.	Объемная масса (d_o)	0,13±0,01
4.	Пористость (P_c)	0,91±0,03
5.	Порозность ($P_{ш}$)	0,04±0,01
6.	Свободный объем слоя сырья (V)	0,92±0,10

Таблица 32 - Содержание экстрактивных веществ в траве золотарника канадского и коэффициенты поглощения экстрагентов

Экстрагент	Коэффициент поглощения экстрагента	Содержание экстрактивных веществ, %
Вода очищенная	3,49±0,04	40,65
30% этанол	3,89±0,05	38,90
50% этанол	3,39±0,03	36,03
70% этанол	3,20±0,04	31,09
96% этанол	2,80±0,03	27,10

Ниже приведена таблица по сравнению показателей качества ЛРС травы золотарника канадского проекта ФС и ФС 42-2777-91. Измерения проводились для 6 образцов в 3 повторностях. (табл. 33).

Таблица 33 - Отдельные показатели качества травы золотарника канадского

Показатель	Полученные результаты, %	Рекомендованная норма, для проекта фармакопейной статьи, %	Числовые показатели на траву золотарника канадского, % по ФС 42-2777-91 [91]
Влажность	8,0-10,0	Не более 10,0	Не более 12,0
Зола общая	7,6-10,0	Не более 10,0	Не более 11,0
Зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты	1,9-2,0	Не более 2,0	Данные отсутствуют
Частицы, проходящие сквозь сито с отверстием 3 мм	4,5-5,0	Не более 5,0	Данные отсутствуют
Сырье, изменившее окраску	1,0-3,0	Не более 3,0	Данные отсутствуют
Органические примеси	0,2-2,0	Не более 1,0	Не более 3,0
Минеральные примеси	0,1-0,5	Не более 0,5	Не более 1,5
Стебли диаметром выше 2 мм	2,0	Не более 2,0	Данные отсутствуют
Содержание радионуклидов (Sr-90)	Не обнаружено	28,63–39,72 Бк/кг(л)	Данные отсутствуют
Микробиологическая чистота: Аэробные бактерии	$1,0 \cdot 10^5 - 1,5 \cdot 10^5$	$1,0 \cdot 10^5 - 1,5 \cdot 10^5$	Данные отсутствуют
Дрожжевые и плесневые грибы	$1,1 \cdot 10^2 - 1,6 \cdot 10^2$	$1,1 \cdot 10^2 - 1,6 \cdot 10^2$	Данные отсутствуют
<i>Escherichia coli</i>	$0,2 \cdot 10 - 0,8 \cdot 10$	$0,2 \cdot 10 - 0,8 \cdot 10$	Данные отсутствуют
Семейства <i>Enterobacteriaceae</i>	Не обнаружено	Не обнаружено	Данные отсутствуют
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Не обнаружено	Не обнаружено	Данные отсутствуют
<i>Staphylococcus aureus</i>	Не обнаружено	Не обнаружено	Данные отсутствуют
<i>Salmonella</i>	Не обнаружено	Не обнаружено	Данные отсутствуют

При определении сроков годности сырья было отмечено, что при хранении травы золотарника канадского в бумажных пакетах, в хорошо проветриваемом, сухом помещении, в местах, защищенных от прямых солнечных лучей, содержание основной группы БАВ практически не снижается в течение 2 лет (содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сырье $3,89 \pm 0,18 \%$).

При определении микробиологической чистоты образцов сырья *S. canadensis* L. отмечено, что сырье удовлетворяет требованиям в соответствии с ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота».

Анализ радионуклидов в сырье проводился по методикам, представленными в ГФ РФ XIV издания. Была проведена регистрация сцинтилляционных спектров гамма-излучения. Полученные данные показали, что исследуемые образцы растительного сырья *S. canadensis* L. соответствуют требованиям СанПиН 2.3.2.1078-01 с изменениями 1, 2, 5 пп. 1.6.10 (таблица 32).

Из данных таблицы следует, что исследуемое сырье *S. canadensis* L. надлежащего качества. Числовые показатели находятся в пределах допустимых значений, содержание микроорганизмов (микробиологическая чистота) соответствует требованиям, предъявляемым к ЛРС. Полученные результаты позволяют установить показатели и нормы качества измельченного сырья *S. canadensis* L. (таблица 34).

Таблица 34 - Показатели и нормы качества сырья травы золотарника канадского

Показатели	Методы	Норма
Внешние признаки	ГФ РФ XIV издания ОФС.1.5.1.0002.15 «Травы»	Данные ФС дополнены
Микроскопия	ГФ РФ XIV издания ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов»	Данные ФС по микроскопии листа дополнены, включая микрофотографии. Также имеются данные о микроскопии стебля и соцветий.

Подлинность	ГФ РФ XIV издания ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография», ТСХ	Предложен метод ТСХ
Влажность	ГФ РФ XIV издания ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья»	Не более 10%
Зола общая	ГФ РФ XIV издания ОФС.1.2.2.2.0013.15 «Зола общая»	Не более 8%
Зола, нерастворимая в 10% растворе кислоты хлористоводородной	ГФ РФ XIV издания ОФС.1.5.3.0005.15 «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте»	Не более 2%
Измельченность	ГФ РФ XIV издания ОФС.1.5.3.0004.15 «Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»	Не более 5% частиц, проходящих сквозь сито 3 мм
Пожелтевшие листья и черешки		Не более 3%
Органическая примесь		Не более 1%
Минеральная примесь		Не более 0,5%
Микробиологическая чистота	ГФ РФ XIV издания ОФС.1.2.4.0002.15 «Микробиологическая чистота»	Категория 4А
Количественное определение	ГФ РФ XIV издания ОФС.1.2.1.1.0003.15 «Спектрофотометрия в УФ и видимой областях»	Флавоноидов в пересчете на рутин не менее 2,5%
Экстрактивные вещества, извлекаемые водой	ГФ РФ XIV издания ОФС.1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»	Не менее 1%
Экстрактивные вещества, извлекаемые 70% спиртом		Не менее 1%

Ниже приведена таблица 35, в которой отражено сравнение ФС 42-2777-91 «Трава золотарника канадского» и проекта фармакопейной статьи «Золотарника канадского трава», оформленной по современным требованиям.

Таблица 35 - Сравнение ФС 42-2777-91 и проекта ФС «Золотарника канадского трава»

Показатель	ФС 42-2777-91	Проект ФС «Золотарника канадского трава»
Внешние признаки	Описание измельченного сырья.	Описание цельного сырья, измельченного сырья, порошка
Микроскопия	Описание микроскопии листа с поверхности	Описание микроскопии листа с поверхности с фотографиями, описание микроскопии стебля (поверхности, продольный срез, поперечный срез) с фотографиями, описание микроскопии ложноязычкового цветка с фотографиями, описание микроскопии трубчатого цветка с фотографиями, описание микроскопии листочка обертки соцветия с фотографиями. По каждому органу приведены гистохимические реакции с суданом III.
Качественные реакции	Цианидиновая проба	1. ТСХ (сравнение зон адсорбции извлечения с зонами адсорбции стандартов рутина, хлорогеновой кислоты) 2. Качественная реакция на дубильные вещества
Числовые показатели	Влажность, зола общая, пожелтевшие и побуревшие листья, органическая примесь, минеральная примесь	Влажность; зола общая; зола, нерастворимая в HCl; измельченность сырья; посторонние примеси; органическая примесь; минеральная примесь; тяжелые металлы и мышьяк; радионуклиды; остаточные количества пестицидов; микробиологическая чистота.

Количественное определение	СФМ сумма флавоноидов в пересчете на рутин. В качестве раствора сравнения используется раствор хлорида алюминия. Методика включает построение калибровочного графика.	СФМ сумма флавоноидов в пересчете на рутин. В качестве раствора сравнения разбавленный раствор извлечения без добавления хлорида алюминия. СФМ сумма гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту.
----------------------------	---	---

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Изучен качественный состав сырья травы *S. canadensis* L., установлено содержание флавоноидов, свободных органических кислот, гидроксикоричных кислот, дубильных веществ, эфирных масел.

2. Качественный состав БАВ травы золотарника канадского изучен методами ТСХ, ВЭЖХ, СФМ. Впервые изучен минеральный состав травы золотарника канадского методом ЭД-РФА.

3. Методами ВЭЖХ, ТСХ и СФМ были идентифицированы 15 соединений: аскорбиновая, винная, галловая, кофейная, лимонная, феруловая, фумаровая, хинная, хлорогеновая, цикориевая, щавелевая, яблочная, янтарная кислоты, рутин, гиперозид,

4. Количественный анализ содержания групп БАВ в траве золотарника канадского проводили методами спектрофотометрии, титриметрии и ВЭЖХ. Исследования показали наличие в сырье (%): кислоты аскорбиновой, танина, кислоты галловой, флавоноидов в пересчете на рутин, хлорогеновой кислоты, и тд.

5. Усовершенствована и валидирована методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин методом спектрофотометрии в траве золотарника канадского – $4,15 \pm 0,18$ % в пересчете на сухое вещество. Разработана и валидирована методика количественного определения суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту $4,63 \pm 0,27\%$ в пересчете на сухое вещество.

5. Впервые изучен состав органических кислот в траве золотарника канадского методом ВЭЖХ. Определены следующие кислоты мг /100 г (с пересчетом на сухое вещество): аскорбиновая $11,3 \pm 0,8$; лимонная $11,1 \pm 0,8$; винная $6,3 \pm 0,3$; янтарная $66,7 \pm 2,5$; галловая $96,2 \pm 3,7$; яблочная $36,2 \pm 3,9$; щавелевая $200,1 \pm 5,4$; фумаровая $5,0 \pm 1,1$.

6. Впервые изучен состав гидроксикоричных кислот в траве золотарника канадского методом ВЭЖХ. Определены следующие кислоты мг /100 г (с пересчетом на сухое вещество): цикориевая $240,0 \pm 6,3$;

хлорогеновая $320,2 \pm 5,4$; кофейная $600,1 \pm 12,3$; хинная $80,7 \pm 4,7$; феруловая $4,3 \pm 0,7$.

7. Определено содержание дубильных веществ двумя методами: в пересчете на танин (титрование KMnO_4) $2,87 \pm 0,20\%$ и в пересчете на галловую кислоту (СФМ) $2,65 \pm 0,21\%$.

8. Впервые определено содержание полисахаридов в траве золотарника канадского методом гравиметрия $4,32 \pm 0,21\%$, методом СФМ $5,20 \pm 0,27\%$.

9. Определены технологические параметры и числовые показатели сырья травы золотарника канадского. Установлены показатели в соответствии со стандартом качества по ОФС «Трава», которые отсутствовали в ФС на траву золотарника канадского: зола, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты; измельченность; сырье, изменившее окраску; стебли диаметром выше 2 мм, тяжелые металлы, микробиологическая чистота.

ГЛАВА 5 ИССЛЕДОВАНИЕ ИЗВЛЕЧЕНИЙ И РАЗРАБОТКА МЕТОДИК АНАЛИЗА КАЧЕСТВЕННОГО И КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ БАВ ИЗ ТРАВЫ ЗОЛОТАРНИКА КАНАДСКОГО

5.1. Исследование водного извлечения из травы золотарника канадского

Получение водных извлечений из травы золотарника канадского регламентируется ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары». Нами получены водные извлечения из высушенного измельченного сырья травы золотарника канадского с учетом коэффициента водопоглощения для определения показателей качества. Соотношение сырья и экстрагента составляло 1:10.

Анализ водных извлечений проводился по показателям: описание, pH водного извлечения, определение сухого остатка (по методикам, описанным в ГФ РФ XIV издания), количественного содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин. Результаты представлены в таблице 36. На рисунке 26 представлен спектр поглощения настоя из травы золотарника канадского до реакции с хлоридом алюминия, на рисунке 27 – спектр поглощения настоя травы золотарника канадского после реакции с хлоридом алюминия.

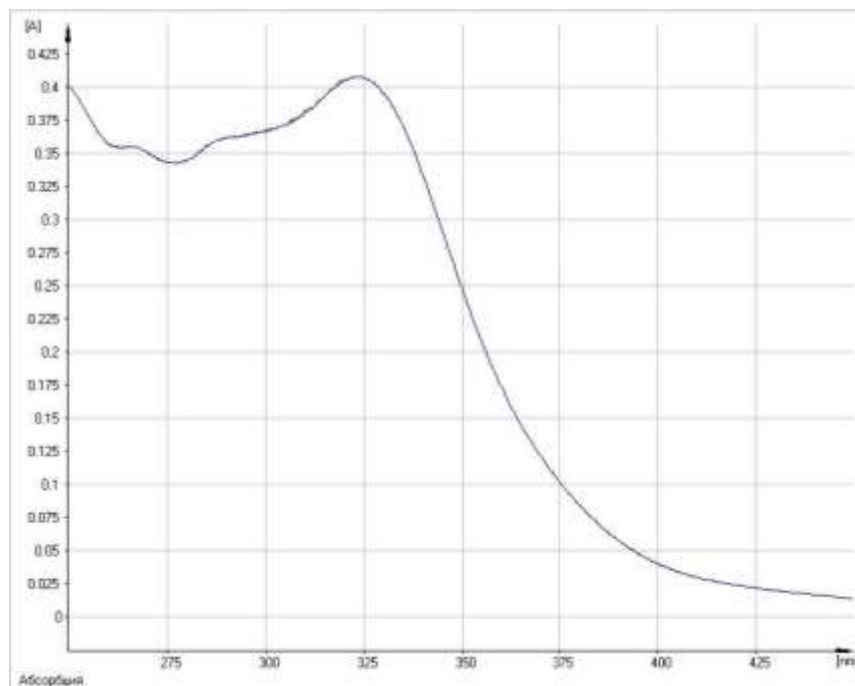


Рисунок 26 – Спектр поглощения настоя из травы золотарника канадского.

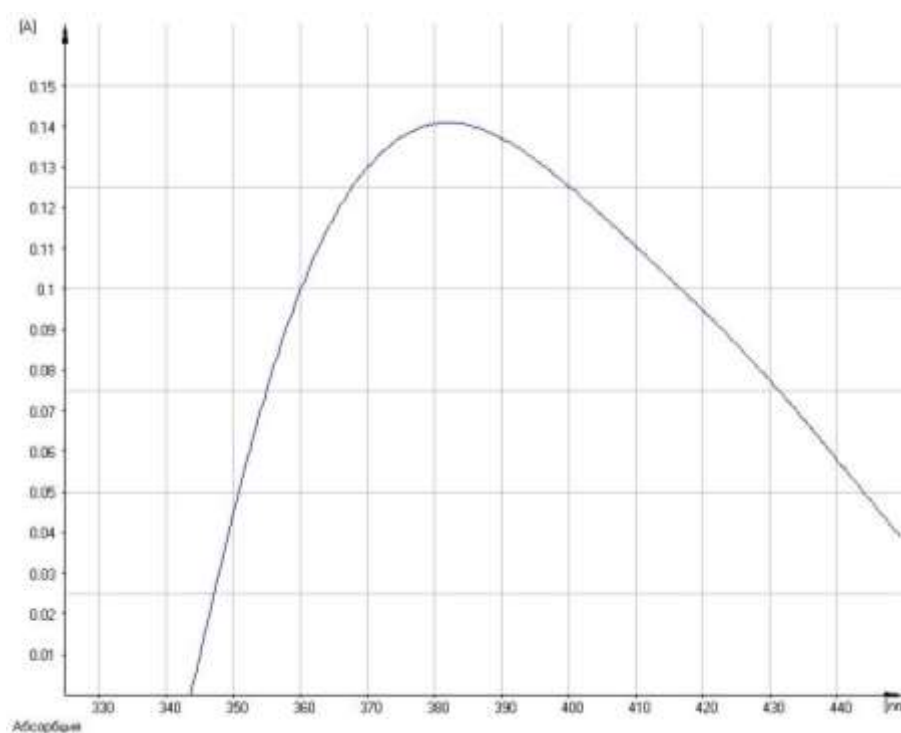


Рисунок 27. Спектр поглощения настоя из травы золотарника канадского после реакции с алюминия хлоридом

Таблица 36 – Определение показателей качества водного извлечения из травы золотарника канадского

Показатель	Полученные результаты
Описание	Цвет светло-коричневый. Запах слабый. Вкус горьковатый, слабовяжущий
рН водного извлечения	$6,15 \pm 0,13$
Определение сухого остатка, %	$1,59 \pm 0,05$
Количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, %	$1,58 \pm 0,16$

5.2. Исследование спирто-водного извлечения из сырья трава золотарника канадского

Для оценки возможности использования предложенных нами методик качественного и количественного определения БАВ в сырье трава золотарника канадского нами были получены экспериментальные образцы

спирто-водных извлечений, которые использовались для проведения исследований по оценке идентификации и содержания БАВ. Разработка технологии получения спирто-водного извлечения из ЛРС требует проведения предварительных исследований, которые направлены на изучение факторов, влияющих на процесс и выход экстрактивных веществ. При экстрагировании БАВ из ЛРС путь к веществам в клетках проходит через клеточную мембрану, являющуюся полупроницаемой. Для выбора оптимальной технологии приготовления были использованы различные экстрагенты и условия экстракции растительного сырья. В данном исследовании нами было изучено влияние факторов на процесс экстрагирования: способ экстрагирования и способ очистки.

Оценивание влияния вышеперечисленных факторов проводилось с помощью уравнения регрессии. Оптимальные условия получения спирто-водного извлечения были выявлены методом крутого восхождения по Боксу-Уилсону. Данный метод уже был применен для установления оптимальных условий некоторых видов ЛРС [5,6,40].

Спирто-водное извлечение (1 : 5 масса сырья / объем спирто-водного извлечения) из травы золотарника канадского получали тремя способами. Объем экстрагента рассчитывали по формуле:

$$V_{\text{экстрагента}} = V_{\text{извлечения}} * m_c * K_{\text{сп}}$$

где $V_{\text{экстрагента}}$ – объем экстрагента, мл;

$V_{\text{извлечения}}$ - заданный объем спирто-водного извлечения, мл;

m_c – масса сырья, г;

$K_{\text{сп}}$ – коэффициент спирта поглощения сырья.

Т.к. основными группами БАВ в траве золотарника канадского являются флавоноиды и ГКК, выбор экстрагента основывался на выделении данных веществ. По экспериментальным данным флавоноиды и ГКК извлекаются спиртом 70-96 % концентрации.

Способ № 1. Настаивание сырья проводили с двумя экстрагентами - спиртом 70% и спиртом 96%. Сырье взвешивается, отмеряется количество

двух экстрагентов (2 части – 70% спирт, 1 часть – 96%). Первую порцию 70% спирта этилового добавляют к сырью и настаивают 24 часа. Полученное извлечение сливают, к сырью добавляют вторую порцию этилового спирта 70% и настаивают также 24 часа. Полученное извлечение сливают, к сырью добавляют 96% этиловый спирт, настаивают 24 часа. Полученные извлечения объединяют (спирто-водные извлечения 1, 4, 7). Очистку проводят одним из трех способов: 1) осаждением при температуре 8°C в течение 24 часов с последующим фильтрованием через бумажный фильтр; 2) фильтрованием через бумажный фильтр; 3) центрифугирование (2000 об/мин в течение 5 минут).

Способ № 2. Настаивание сырья травы золотарника канадского проводили только в спирте 70%. Объем, необходимый для экстрагирования и рассчитанный для спирто-водного извлечения 1:5, делили на три равные части. Сырье заливают порциями экстрагента, нагревали в интервале температур 80-90°C оставляют настаиваться на 24 часа. Процедуру повторяют еще 2 раза после сливания экстрагента. Далее полученное извлечение сливали, сырье заливали третьей порцией спирта 70% и на кипящей водяной бане 30 минут. Полученные извлечения объединяли (спирто-водные извлечения 2, 5, 8). Очистку проводили одним из трех способов: 1) осаждением при температуре 8°C в течение 24 часов с последующим фильтрованием через бумажный фильтр; 2) фильтрованием через бумажный фильтр; 3) центрифугированием (2000 об/мин в течение 5 минут).

Способ № 3. Спирто-водное извлечение было получено путем настаивания сырья травы золотарника канадского в соотношении 1:5 70% спиртом. Объем экстрагента, рассчитанный по выше приведенной формуле, делили на три равные части. Сырье заливали 70% спиртом этиловым и оставляли настаиваться на 24 часа. Затем извлечение сливали и повторяли процедуру еще 2 раза. Полученные извлечения объединяли (спирто-водные извлечения 3, 6, 9). Очистку проводили одним из трех способов: 1)

осаждением при температуре 8°C в течение 24 часов с последующим фильтрованием через бумажный фильтр; 2) фильтрованием через бумажный фильтр; 3) центрифугированием (2000 об/мин в течение 5 минут).

Для определения наиболее оптимальной технологии получения спирто-водного извлечения провели изучение качественного состава, а также количественного содержания в них суммы флавоноидов в пересчете на рутин.

Полноту извлечения оценивали по цианидиновой пробе (качественная реакция на флавоноиды).

5.2.1 Исследование влияний изменения технологических параметров на выход БАВ

Способ экстракции, а также его очистка оказывает большое влияние на выход БАВ и последующее количественное определение БАВ из ЛРС в состав ЛС, и, следовательно, на лекарственные свойства. При использовании различных методов получения спирто-водных извлечений: от выбора экстрагента, изменения концентрации экстрагента в процессе извлечения, температурного режима экстрагирования до способа очистки влияют на итоговое содержание групп БАВ.

Для определения оптимального способа получения спирто-водного извлечения из травы *S. canadensis* L. использовался двухфакторный метод математического планирования эксперимента с двумя повторными наблюдениями. Факторами, наиболее значимыми, были выбраны и изучены: А – способ извлечения; В – метод очистки (таблица 37).

Таблица 37 – Факторы, влияющие на состав, и их обозначения

А – способ извлечения	В – способ очистки
А1 - Способ № 1	В1 – Осаждение при температуре 8°C
А2 – Способ № 2	В2 - Фильтрование
А3 - Способ № 3	В3 - Центрифугирование

Была составлена схема эксперимента (таблица 38). На основании схемы эксперимента составлена матрица получения спирто-водного извлечения из сырья золотарника канадского (таблица 39).

Таблица 38 - Схема эксперимента

Фактор В	Фактор А		
	А1	А2	А3
В1	Извлечение 1	Извлечение 2	Извлечение 3
В2	Извлечение 4	Извлечение 5	Извлечение 6
В3	Извлечение 7	Извлечение 8	Извлечение 9

Таблица 39 - Матрица эксперимента

№	Условия экстрагирования	
	Способ экстракции	Метод очистки
1	Способ № 1	Осаждение при температуре 8° С
2	Способ № 2	Фильтрование
3	Способ № 3	Центрифугирование
4	Способ № 1	Осаждение при температуре 8° С
5	Способ № 2	Фильтрование
6	Способ № 3	Центрифугирование
7	Способ № 1	Осаждение при температуре 8° С
8	Способ № 2	Фильтрование
9	Способ № 3	Центрифугирование

При оценивании результатов эксперимента определяли количественное содержание флавоноидов в пересчете на рутин (целевая группа БАВ). Данные представлены на рисунке 28 [5,6].

На рисунке представлена диаграмма по исследуемым спирто-водным извлечениям по содержанию суммы флавоноидов в пересчете на рутин (среднее значение по трем повторностям).



Рисунок 28. Диаграмма содержания флавоноидов в пересчете на рутин в спирто-водных извлечениях.

По данным дисперсионного анализа (таблица 40) было определено, что наиболее оптимальный метод экстрагирования - это способ № 1, а способ очистки – отстаивание при температуре 8°C.

Таблица 40 – Результаты дисперсионного анализа по влиянию факторов на выход суммы флавоноидов.

	SS (сумма квадратов)	Степень свободы	MS (средний квадрат)	F (критерий Фишера)	P (вероятность)
Способ экстрагирования	0,467	2	0,233	20,151	0,000 (< 5%)
Способ очистки	0,866	2	0,433	37,326	0,000 (< 5%)
Ошибка	0,209	18	0,012	-	-
Общая сумма	1,792	26	-	-	-

5.2.2. Изучение состава спирто-водных извлечений методом ТСХ

Качественное обнаружение флавоноидов состава флавоноидов проводили ТСХ методом.

Для исследования полифенольных соединений травы и спирто-водных извлечений из травы золотарника канадского методом ТСХ нами была выбрана методика, описанная в гл. 2.

При хроматографировании 9 спирто-водных извлечений были обнаружены следующие вещества во всех образцах: рутин, хлорогеновая кислота, кверцетин, гиперозид (R_f пятен всех 9 спирто-водных извлечений соответствуют R_f пятнам стандартов).

5.2.3. Количественное определение флавоноидов в спирто-водном извлечении травы золотарника канадского

Для количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин применялась спектрофотометрическая методика (раздел 2.6). Спектр поглощения спирто-водного извлечения из травы золотарника канадского показан на рисунке 29.

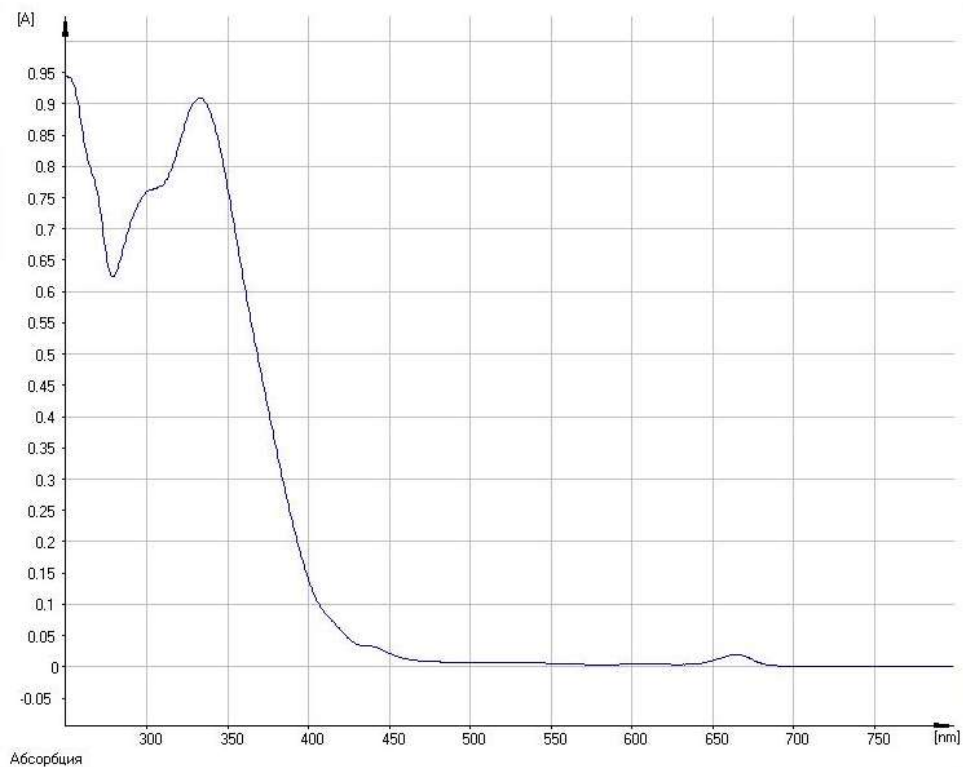


Рисунок 29. Спектр поглощения спирто-водного извлечения из травы золотарника канадского.

Валидация методики проводилась в диапазоне значений оптической плотности от 0,2 до 0,9. Ниже приведены результаты оценки линейности (таблица 41, рисунок 30), повторяемости, воспроизводимости (таблица 42), правильности (таблица 43).

Таблица 41 – Результаты оценки линейности методики

№ образца	Аликвотная доля, мл	Оптическая плотность, А
1	0,75	0,2071
2	1,00	0,2699
3	1,25	0,3458
4	1,50	0,4152
5	1,75	0,4792

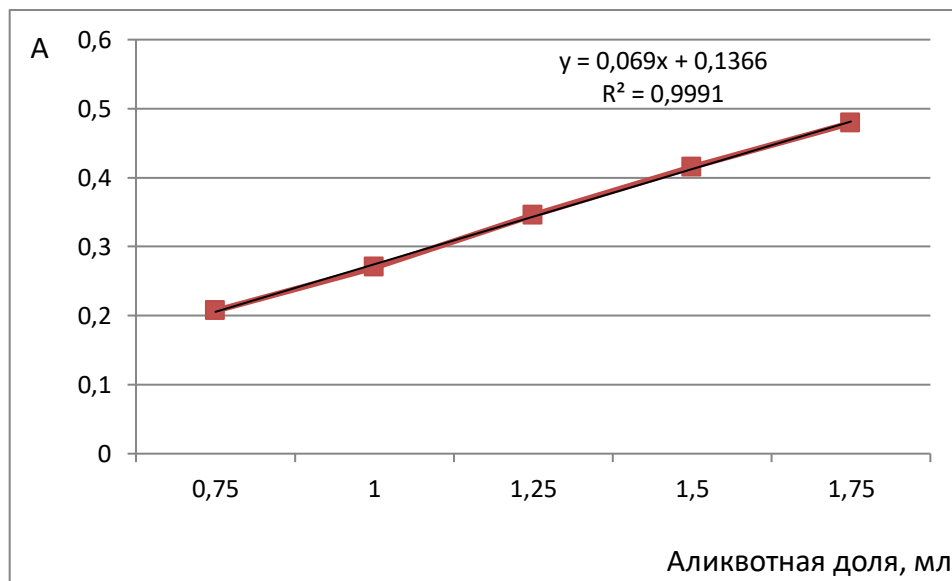


Рисунок 30. Линейность методики количественного определения рутина в спирто-водном извлечении.

Линейность методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в спирто-водном извлечении травы золотарника канадского доказывали в диапазоне аликвотной доли от 0,75 до 1,75 мл в диапазоне оптической плотности от 0,2 до 0,9. Для установления применения СФМ методики строили график зависимости оптической плотности А от аликвотной доли (рисунок 30). Коэффициент корреляции составил $R^2=0,9991$, что говорит о линейной зависимости между аликвотной долей и оптической плотностью.

Для установления сходимости результатов проводили испытание 6 образцов. Сходимость результатов оценивалась путем вычисления среднего

значения, стандартного отклонения, коэффициента вариации и доверительного интервала (таблица 42).

При сравнении результатов, полученных в разные дни (аналитик 1 и 2), вычисленное значение критерия Фишера $F_{пр} = 0,87$ не превышало табличного значения (0,17) (таблица 41). Следовательно, различие дисперсий статистически незначимо. Вычисленное значение критерия Стьюдента $t_{пр} = 0,60$ также не превышало табличного значения (2,228). На основании этого можно сделать вывод об отсутствии статистически значимых различий между результатами анализов. Т.к. $F_{пр} < F_{таб}$ и $t_{пр} < t$, то различия между соседними значениями и стандартными отклонениями случайны. Таким образом, при определении прецизионности установлена сходимость и промежуточная прецизионность результатов определения по предложенной методике.

Таблица 42 - Результаты оценки воспроизводимости методики

№	Аналитик 1 Содержание суммы флавоноидов, %	Статистические характеристики	Аналитик 2 Содержание суммы флавоноидов, %	Статистические характеристики
1	0,81	$X_{ср} = 0,83$	0,84	$X_{ср} = 0,84$
2	0,85	$X_{min} = 0,81$	0,87	$X_{min} = 0,81$
3	0,81	$X_{max} = 0,86$	0,83	$X_{max} = 0,87$
4	0,86	$S = 0,021$	0,82	$S = 0,021$
5	0,81	$S^2 = 0,00042$	0,84	$S^2 = 0,0004$
6	0,83	$RSD = 2,69\%$ $ДИ(p=95\%) =$ $0,83 \pm 0,02$	0,81	$RSD = 2,48\%$ $ДИ(p=95\%) =$ $0,84 \pm 0,02$
$F(5\%;5;5) = 5,05; t(5\%;10) = 2,228$			$F_{пр} = 0,87; t_{пр} = 0,60$	

Для установления правильности определяли открываемость методом добавок. Изготавливали спирто-водные извлечения с добавлением известного количества СО рутина (0,010; 0,020; 0,030 г). На каждом уровне проводилось по три измерения. СФМ методика признана правильной, т.к. результаты приближаются к истинному значению, а относительная погрешность не превышает 2% (таблица 43).

Таблица 43 - Результаты подтверждения правильности методики

№ образца	Содержание суммы флавоноидов в пробе, г	Добавлено СО рутина, г	Содержание		Открываемость, %
			ожидаемое, г	полученное, г	
1	0,0086	0,010	0,0186	0,0189	101,61
	0,0086	0,020	0,0286	0,0283	98,95
	0,0086	0,030	0,0386	0,0381	98,70
2	0,0112	0,010	0,0212	0,0216	101,89
	0,0112	0,020	0,0312	0,0315	100,96
	0,0112	0,030	0,0412	0,0407	98,79
3	0,0097	0,010	0,0197	0,0195	98,98
	0,0097	0,020	0,0297	0,0299	100,67
	0,0097	0,030	0,0397	0,0394	99,24
Метрологическая характеристика: $X_{cp} = 99,98\%$. $RSD = 1,29\%$					

Из данных таблиц (41-43) следует, что методика определения содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в спирто-водных извлечениях из травы *S. canadensis* L. соответствует критериям линейности, повторяемости, воспроизводимости, правильности и может быть применена. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в спирто-водных извлечениях из травы золотарника составляет $0,830 \pm 0,022\%$.

5.2.4. Показатели качества спирто-водного извлечения из травы золотарника канадского

Для спирто-водного извлечения из травы золотарника канадского были определены показатели качества в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV (таблица 44).

Таблица 44 - Показатели качества спирто-водного извлечения из травы золотарника канадского

Показатель	Метод	Значение
Описание	ГФ РФ XIV «Настойки»	Цвет зеленовато-коричневый, запах специфический
Плотность	ГФ РФ XIV ОФС «Плотность»	0,8938 г/см ³

Качественный анализ	ТСХ	Зоны адсорбции, совпадающие с СО рутина, СО хлорогеновой кислоты, СО гиперозида и СО кверцетина
Количественный анализ	СФМ	Сумма флавоноидов в пересчете на рутин не менее 0,80%
Сухой остаток	ГФ РФ XIV «Настойки»	Не менее 2%
Спирт этиловый	ОФС «Определение спирта этилового в жидких фармацевтических препаратах»	Не менее 70%
Тяжелые металлы	ОФС «Тяжелые металлы»	Не более 0,001%
Метанол и 2-пропанол (контролируется в течение технологического процесса)	ОФС «Определение метанола 2-пропанола»	Не более 0,05% метанола и не более 0,05% 2-пропанола
Микробиологическая чистота	ОФС «Микробиологическая чистота»	В соответствии с требованиями ГФ XIV

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. При подборе оптимального метода получения спирто-водного извлечения было выявлено, что наибольший выход рутина из травы золотарника канадского является способ №1 (дробная мацерация с изменением концентрации экстрагента), способ очистки – осаждение при 8°C с последующим фильтрованием.
2. При качественном анализе спирто-водных извлечений, полученных разными способами, было обнаружено, что данные извлечения содержат ключевые БАВ: гиперозид, рутин, кверцитин, хлорогеновая кислота.
3. Методика количественного анализа флавоноидов в пересчете на рутин в спирто-водных извлечениях валидирована по показателям линейность, повторяемость, прецизионность, правильность.
4. Описаны показатели качества водного и спирто-водного извлечений согласно требованиям ГФ XIV издания.

ГЛАВА 6 ИЗУЧЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ТРАВЫ ЗОЛОТАРНИКА КАНАДСКОГО ИЗВЛЕЧЕНИЙ НА ЕГО ОСНОВЕ

6.1. Изучение антиоксидантной активности сырья травы золотарника канадского

Золотарник канадский содержит в своем составе различные полифенольные соединения, поэтому нами было решено провести изучение его антиоксидантной активности. Известно, что гидроксикоричные кислоты, обнаруженные в траве золотарника канадского, такие как хлорогеновая, кофейная, цикориевая, хинная, ферулловая, обладают антиоксидантной активностью [104,105,116,123,124,133]. Учитывая имеющиеся литературные данные, характеризующие наличие у травы золотарника канадского антиоксидантного действия, (сырье, заготовленное в Венгрии и Польше) [82,131], а также влияния на антиоксидантную активность районов произрастания и условий культивирования, мы сочли целесообразным провести оценку антиоксидантной активности травы золотарника канадского и спирто-водных извлечений, получаемых на его основе, которые в дальнейшем планируется использовать для получения ЛС стоматологического назначения.

Антиоксидантная активность травы золотарника канадского была определена с помощью методики, основанной на реакции веществ, обладающих антиоксидантной активностью с 1,1-дифенил-2-пикрил-гидразилового радикала (DPPH). Данный радикал имеет максимум поглощения при длине волны 517 нм. При взаимодействии DPPH с веществами, обладающими антиоксидантной активностью, количество свободных радикалов уменьшается и, соответственно, понижается поглощение [129].

Для изучения антиоксидантной активности сырья методом спектрофотометрии нами была проведена пробоподготовка с получением извлечений из травы золотарника канадского в соотношении 1:10 с

использованием в качестве экстрагента спирта этилового 70% (раздел 2.7). Нами был выбран в качестве экстрагента раствор этилового спирта 70%, т.к при данной концентрации спирта проявляется наибольший выход ГКК (раздел 4.2.5, [69]), которые проявляют антиоксидантную активность.

Измерения проводились в диапазоне значений поглощения 0,2 - 0,7. Опыт был повторен 3 раза, доверительный интервал составлял 0,95 с применением коэффициента Стьюдента. Результаты приведены в таблице 45.

Таблица 45 – Результаты изучения антиоксидантной активности травы золотарника канадского

Время, прошедшее после начала реакции между раствором DPPH и извлечения из травы золотарника канадского, мин	Степень ингибирования радикалов DPPH, %
15	37,51 ± 0,83
30	41,37 ± 1,04
45	46,42 ± 1,35
60	47,26 ± 1,32

По результатам, приведенным в таблице 45, можно сделать вывод об антиоксидантной активности травы золотарника канадского. Ингибирование радикалов DPPH происходит в первые 15 минут и затем постепенно уменьшается в течение часа до 47,26 ± 1,32%.

6.2. Изучение антиоксидантной активности спирто-водного извлечения из травы золотарника канадского

Чтобы определить возможность использования спирто-водных извлечений травы золотарника канадского для лечения и профилактики заболеваний пародонта, воспалительный процесс которого включает перекисное окисление липидов, было проведено исследование

антиоксидантной активности данных спирто-водных извлечений. Для решения данного вопроса использовался метод, описанный в разделе 2.7.

Аликвотные доли спирто-водных извлечений, полученные способом № 1, описанным в разделе 5.2, были лиофилизированы (5, 10, 50, 100 мкг), а затем растворены в 1 мл метанола. Полученные растворы добавлялись к раствору DPPH (10 мкг, 1 мл метанола). Смесь перемешивалась, а затем измерялась интенсивность поглощения при длине волны 517 нм через 5, 10, 15 и 30 минут от начала реакции. Измерения проводились в диапазоне значений поглощения 0,2 - 0,7. Опыт был повторен 3 раза, доверительный интервал составлял 0,95 с применением коэффициента Стьюдента. Результаты представлены в таблице 46.

Как видно из таблицы 46, спирто-водное извлечение из травы золотарника канадского обладает антиоксидантной активностью (происходит снижение концентрации DPPH), при этом наблюдается резкое уменьшение поглощения в первые минуты реакции, а затем постепенное небольшое снижение (рисунок 31).

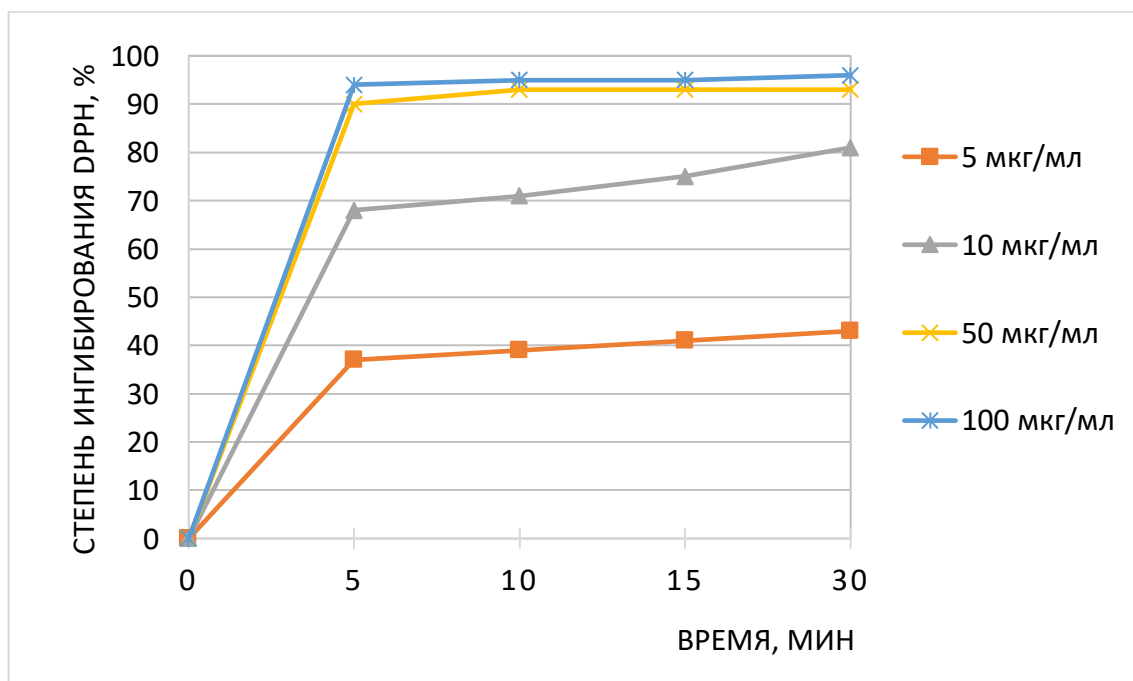


Рисунок 31 – Сравнение степени ингибирования DPPH в зависимости от концентрации спирто-водного извлечения травы золотарника канадского и времени реагирования.

Таблица 46 - Определение антиоксидантной активности спирто-водного извлечения

Концентрация спирто-водного извлечения, мкг/мл	Концентрация DPPH, мкг/мл	Время, мин			
		5	10	15	30
		Степень ингибирования радикалов DPPH после смешивания со спирто-водным извлечением, %			
5	10	37,12±1,14	39,51±0,86	41,63±0,96	43,37±1,27
10	10	68,34±1,52	71,47±1,99	75,18±1,86	81,45±2,12
50	10	90,47±2,65	93,15±2,73	93,42±2,43	93,91±2,75
100	10	94,65±2,42	95,13±2,64	95,78±2,79	96,56±2,83

6.3. Изучение антибактериальной активности спирто-водного извлечения из травы золотарника канадского

Учитывая результаты исследования научной литературы, описывающие наличие у извлечений из травы золотарника канадского антибактериального действия, мы сочли целесообразным проведение оценки антибактериальной активности на штаммах микроорганизмов, наиболее часто выявляемых в микробиотах воспаленного пародонта, которые по мнению отечественных и зарубежных специалистов стоматологов оказывают наиболее важное влияние на развитие воспалительных процессов в пародонте [9,10,19].

Данные бактерии обладают широкой антибактериальной резистентностью, что является ключевым фактором при антибиотикотерапии.

Результаты исследований антибактериальной активности, проведенной с помощью методики описанной в главе 2, представлены в таблице 47. Результаты исследования антибактериальных свойств спирто-водного извлечения подтвердили наличие умеренного антимикробного действия в отношении тест-штамма *Bacillus cereus* ATCC 11778 и слабого

антимикробного действия в отношении тест-штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 [129].

Таблица 47 – Определение антибактериальной активности спирто-водного извлечения

Тест - штамм	Диаметр зон подавления роста, мм (n=4)					
	Спирто-водное извлечение (1)	Спирто-водное извлечение в разведении 1:9 (2)	Спирто-водное извлечение в разведении 1:99 (3)	Контроль (70% этиловый спирт) (4)	7% этиловый спирт (5)	0,7% этиловый спирт (6)
<i>Bacillus cereus</i>	14,5	-	-	9,0	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	11,0	-	-	8,5	-	-

« - » - зон задержки роста нет

Зная, что данные штаммы бактерий имеют широкую антибиотикорезистентность, а также то, что род *Bacillus* и *Staphylococcus aureus* присутствуют в микробиотах пародонта, вызывая воспалительные процессы в полости рта, можно сделать вывод о перспективности применения спирто-водных извлечений из травы золотарника канадского в стоматологических препаратах.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6

1. Трава золотарника канадского обладает антиоксидантной активностью, при этом наблюдается за первые 15 минут степень ингибирования $37,51 \pm 0,83$ % и $47,26 \pm 1,32$ через час после смешивания извлечения из травы золотарника канадского с раствором радикала DPPH.
2. Спирто-водное извлечение из травы золотарника канадского обладает антиоксидантной активностью, при этом ингибирование радикалов DPPH уменьшается в первые минуты, что говорит о перспективности использования травы золотарника при заболеваниях пародонта.
3. Спирто-водное извлечение из травы золотарника канадского обладает антибактериальной активностью против *Bacillus cereus* ATCC 11778 и слабого антимикробного действия в отношении тест-штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.
4. Учитывая полученные данные об антиоксидантной и антибактериальной активности травы золотарника канадского и извлечений на его основе, можно сделать вывод о перспективности применения травы золотарника канадского для применения при воспалительных заболеваниях полости рта, в основе которых лежит появление бактериальных бляшек и перекисное окисление липидов.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведено информационно-аналитическое изучение литературных источников, необходимое для выработки современных требований к качеству травы золотарника канадского. Показана актуальность создания подходов к стандартизации препаратов на основе травы золотарника канадского (спиртовых извлечений).

2. Экспериментально получены и систематизированы данные о морфолого-анатомическом строении цельного, измельченного сырья травы золотарника канадского (по органам: листья, стебли, соцветия (трубчатые и ложноязычковые цветки, листочки обертки)) и порошка. Выявлены морфологические и анатомические признаки травы золотарника: в препаратах листа с поверхности устьичный комплекс аномоцитного типа, наличие простых многоклеточных толстостенных волосков с бурым содержимым, наличие простых многоклеточных волосков с тонкими стенками, вместилища с бурым содержимым, окрашиваемые суданом III в оранжевый цвет; наличие цветков трубчатого и ложноязычкового типов с включениями каратиноидов; строение хохлаток цветков.

3. С применением комплекса методов доказано наличие и установлено содержание в траве золотарника канадского основных групп БАВ: флавоноиды (рутин, гиперозид, кверцетин), органических (яблочной, янтарной, щавелевой, аскорбиновой, фумаровой, винной, галловой) и гидроксикоричных кислот (цикориевой, кофейной, хинной, хлорогеновой, ферулловой) кислот, углеводов (свободных и связанных), установлен элементный состав. Предложено стандартизовать сырье по содержанию флавоноидов и ГКК.

4. Для идентификации флавоноидов и хлорогеновой кислоты в сырье предложен метод ТСХ. Для количественного анализа усовершенствована и валидирована (по параметрам – линейность, правильность, повторяемость, прецизионность, воспроизводимость) СФМ методика определения содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин, позволяющая более

точно провести количественную оценку по содержанию суммы флавоноидов в сырье. Разработана и валидирована методика определения содержания суммы ГКК в пересчете на хлорогеновую кислоту ЛРС в *S. canadensis*.

5. На основе комплекса использования ТСХ и СФМ разработаны методики качественного и количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в спирто-водном извлечении.

6. Определена антиоксидантная активность травы золотарника канадского, установлена антиоксидантная и антибактериальная активность спирто-водных извлечений из травы золотарника канадского.

7. На основании проведенных исследований обоснованы нормативные показатели качества сырья и разработан проект ФС «Золотарника канадского трава – *Solidaginis canadensis herba*». Дополнены пункты: микроскопия, радионуклиды, содержание тяжелых металлов, усовершенствована методика определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин, добавлена методика количественного определения суммы ГКК в пересчете на хлорогеновую кислоту.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АОЗ – антиоксидантная защита

БАС – биологически активные соединения

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГКК – гидроксикоричные кислоты

ГФ – Государственная фармакопея

ЕФ – Европейская фармакопея

ЛРС – лекарственное растительное сырье

ЛП – лекарственный препарат

ЛС – лекарственное средство

ИК – инфракрасный

ЛП – лекарственный препарат

ЛС – лекарственное средство

МС – масс-спектрометрия

НД – нормативный документ

НФ – неподвижная фаза

ОК – органические кислоты

ПОЛ – перекисное окисление липидов

ПФ – подвижная фаза

РСО – рабочий стандартный образец

РФА –ЭД – энергодисперсионный рентгенофлуоресцентный анализ

СО – стандартный образец

СФМ – спектрофотометрия

ТСХ – тонкослойная хроматография

УФ – ультрафиолетовый (спектр)

ФС – фармакопейная статья

ЯМР – ядерно-магнитный резонанс

Rf – расстояние от линии старта до середины пятна, отнесенное к расстоянию от линии старта до линии фронта растворителя

Rt (retention time) – время удерживания

ЛИТЕРАТУРА

1. Аверьянов С.В. Применение стоматологического геля для лечения воспалительных заболеваний пародонта у детей / Аверьянов С.В. Пупыкина Е.В., Гараева К.Л. // Сб. ст. междунар. науч.практ. конф. «Современные технологии в мировом научном пространстве» (28 сентября 2017 г.). 2017. С. 89-91.
2. Алтынбекова, А.К. Применение фитопрепарата «Тополин с экстрактом ромашки» в комплексном лечении болезней пародонта / А.К. Алтынбекова, К.Д. Алтынбеков, С.С. Жолдыбаев // Фармацевтический бюллетень. – 2016.- № 3-4. – С. 93-101.
3. Анисимова, И.В. Клиническое и лабораторное обоснование местного применения растительных препаратов «Стоматофит» и «Стоматофит А» в комплексном лечении заболеваний слизистой оболочки рта / И.В. Анисимова, М.О. Нагаева // Институт стоматологии. – 2010. - № 1 (46). – С. 55-57.
4. Батюк, В.С. Флавоноиды *Solidago canadensis* и *Solidago virgaurea* / Батюк В.С., Кольцова Л.Ф. // ХПС. - 1985. - №4. – С. 566-567.
5. Бекетов, Е.В. Фитохимическое исследование плодов черемухи обыкновенной (*Radus avium* Mill.). Совершенствование оценки показателей качества : дисс. ... канд. фарм. наук. 15.00.02 / Бекетов Егор Владимирович ; [Место защиты: Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений]. – М., 2005. – 121 с.
6. Беликов, В.Г. Применение методов математического планирования и обработка результатов эксперимента в фармации. – М.: Медицина, 1973. – 231 с.
7. Боровикова, Н.А. Совершенствование контроля качества и стандартизации сырья и водных извлечений, содержащих антраценпроизводные, дубильные вещества, полисахариды и флавоноиды

- : дисс. ... канд. фарм. наук : 14.04.02 / Боровикова Наталья Анатольевна ; Ряз.ГМУ. – Рязань, 2014. – 215 с.
8. Буинов, М.В. Фармакогностическое исследование *Solidago dahurica Kitag.* и разработка лекарственного средства на его основе : дис. ... канд. фарм. наук. : 14.04.02 / Буинов Максим Владимирович ; Иркутский государственный медицинский университет. - Иркутск, 2016. – 179 с.
9. Булкина, Н.В. Быстро прогрессирующий пародонтит: новые аспекты патогенеза и комплексной терапии / Н.В. Булкина, А.П. Ведяева // Пародонтология. – 2012. – Т. 17, № 4(65). – С. 12-18.
10. Булкина, Н.В. Современные аспекты этиологии и патогенеза воспалительных заболеваний пародонта. Особенности клинических проявлений рефрактерного пародонтита / Н.В. Булкина, В.М. Моргунова // Фундаментальные исследования. – 2012. – № 2 (ч. 2). – С. 415-420.
11. Васильев, В.Г. Контроль качества лекарственных средств и объектов растительного происхождения методом спектроскопии ЯМР ¹H без использования стандартных образцов : 14.04.02. дисс. ... канд. хим. наук. : 14.04.02 / Васильев Василий Геннадьевич ; РУДН. – Москва, 2018. – 177 с.
12. Волчегорский, И.А. Сравнительный анализ состояния системы «перекисное окисление липидов - антиоксидантная защита» в слюне больных хроническим пародонтитом легкой и средней тяжести / И.А. Волчегорский, Н.В. Корнилова, И.А. Бутюгин // Стоматология. – 2010. – Т. 89, № 6. - С. 24-27.
13. Гажва, С.И. Сравнительная оценка эффективности лекарственных средств, используемых для лечения воспалительных пародонта / С.И. Гажва, О.В. Шкаредная, Ю.В. Меньшикова // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. – 2011. - №3(19). – С. 65-71.

14. Гончарова, Е.И. Растительные средства в профилактике и лечении заболеваний пародонта / Е.И. Гончарова // Российский стоматологический журнал. – 2012. - №3. – С. 48-52.
15. Горячкина Е.Г., Буинов М.В., Федосеева Г.М. Изучение состава полифенольных соединений золотарника даурского в сравнении с золотарниками канадским и обыкновенным // Вестник бурятского государственного университета. - 2012. - Спецвып. - С. 84-87.
16. Государственная фармакопея РФ XIII издания. Минздрав РФ [Официальный сайт]. URL: <http://www.femb.ru/feml>. Москва, 2015.
17. Государственная фармакопея РФ XIV издания. Минздрав РФ [Официальный сайт]. URL: <http://www.femb.ru/femb/pharmacopea.php>. Москва, 2018.
18. Гринько Е.Н. Исследования по стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего дубильные вещества : дис. ... канд. фарм. наук : 14.04.02. / Гринько Елена Николаевна; Первый моск. гос. мед. ун-т им. И.М. Сеченова. – М., 2011. - 193 л.
19. Грудянов, А.И. Диагностика в пародонтологии [Текст] / Диагностика в пародонтологии / А.И. Грудянов, А.С. Григорьян, О.А. Фролова. - М.: Медицинское информационное агентство, 2004. – 104 с.
20. Гусев, Н.Ф. Перспективы использования лекарственных растений в современной России / Н.Ф. Гусев, Г.В. Петрова, А.В. Филиппова [и др.] // Известия Оренбургского государственного аграрного университета. – 2014. – № 2 (46). – С. 167-170.
21. Евглевский, А.А. Биологическая роль и метаболическая активность янтарной кислоты / А.А. Евглевский, Г.Ф. Рыжкова, Е.П. Евглевская [и др.] // Вестник курской государственной сельскохозяйственной академии. – 2013, – № 9. – С. 67-69.
22. Ермоленко, Т.И. Перспективы применения фитопрепаратов в лечении мочекаменной болезни / Т.И. Ермоленко // Научные ведомости. - 2014. - Вып. 27, № 18 (189). - С. 205-211.

23. Жезняковская, Л.Ф. Стоматологические пленки на основе растительных экстрактов / Л.Ф. Жезняковская, Д.Г. Долинина, Л.Б. Оконенко // Фармация. – 2012. - № 7. – С. 35-37.
24. Заявка 2001126623/14 Российская Федерация, МПК⁷: А61К 35/78. Иммуномодулирующий растительный набор "Звезда Байкала" для непрерывного лечения иммунной недостаточности [Текст] / Бизиков А.А., Дорофеев В.Н., Дугсанова Л.А., Никонова Л.А., Ющенко Г.В., Никонов П.И. ; заявитель Иркутская государственная сельскохозяйственная академия. (дата обращения 1.12.2016)
http://www1.fips.ru/wps/portal/IPS_Ru#1551649129274
25. Заявка 2011127494 Российская Федерация, МПК⁷ А61К 36/00. Композиция и способ для лечения и предупреждения остеоартрита и остеоартроза суставов [Текст] / Трифонов В. Н., Елистратова Ю. А., Елистратов К. Г., Курусь Н. В., Хомякова И. В., Елистратова Т. В.; заявитель Общество с ограниченной ответственностью "Парафарм" ; пат. поверенный Андрущак Г. Н. - № 201127494/15 ; заявл. 05.07.11 ; опубл. 10.01.13, Бюл. № 1 ; приоритет 05.07.11 , № 2509569. – 1 с.
26. Заявка на патент 2014140541 Российская Федерация, МПК⁷ А64К 36/28. Композиция для профилактики и/или лечения дерматоза и способ ее получения [Текст] / Гарсия Хилаберт Х. М. : заявитель Гарсия Хилаберт Х. М. ; пат. поверенный, заявл. 16.03.2013. (дата обращения 1.12.2016)
http://www1.fips.ru/wps/portal/IPS_Ru#1551650911251
27. Заявка на патент 2192877 Российская Федерация, МПК⁷: А61К 35/78. Лечебно-профилактическая композиция ингредиентов для бальзама [Текст] / Кириллов Н. А., Митрасов Ю. Н., Ионова Е. А, Сергеева В. Е. ; заявитель Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова ; пат. поверенный Кириллов Н. А. - № 2001119826/14 ; завл. 16.07.2001 ; опубл. 20.11.02, Бюл. № 32 ; (дата обращения 1.12.2016)
http://www1.fips.ru/wps/portal/IPS_Ru#1551649327554

28. Заявка на патент 2000132964/14: МПК: А61К 35/78. Фитокомплекс для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта, моче- и желчекаменной болезни, гепатита, диабета, для выведения микрोगельминтов; / Ральченко В.Ф., Боярова О.В.; заявитель ООО "Фитомед". (дата обращения 1.12.2016)
http://www1.fips.ru/wps/portal/IPS_Ru#1551649971544
29. Заявка на патент 2206331 С2: МПК: А61К 35/78. Фитокомплекс на основе сборов "Фиторал-1", "Фиторал-2" и "Эковит" для лечения заболеваний желудочно-кишечного тракта, печени, сердечно-сосудистой и мочевыделительной системы диабета и паразитозов / Ральченко В.Ф., Боярова О.В.; заявитель ООО "Фитомед". (дата обращения 1.12.2016)
http://www1.fips.ru/wps/portal/IPS_Ru#1551650122525
30. Заявка на патент: МПК: А61К 35/78. Лечебно-профилактическое средство "Простанорм" для лечения простатитов, уретритов и других воспалительных заболеваний мочеполовой сферы / В.А. Стихин, В.К. Колхир, Т.Е. Трумпе, А.П. Ефремов, А.А. Кирьянов, А.С. Сегал; заявитель Научно-производственное объединение "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений". (дата обращения 1.12.2016)
http://www1.fips.ru/wps/portal/IPS_Ru#1551649879478
31. Заявка на патент: МПК: А61К 7/00. Косметический крем / М.А. Пчелина, Е.Ю. Крапивина, А.Ф. Кинтя, Н.И. Могилевская; заявитель Парфюмерно-косметическая фабрика "Биорика" (МД). (дата обращения 1.12.2016)
http://www1.fips.ru/wps/portal/IPS_Ru#1551650774484
32. Захарова, Н.Г. Совершенствование методов контроля качества многокомпонентных фитопрепаратов "Простанорм" и "Фито Ново-Сед": автореф. дисс. ... канд. фарм. наук./Захарова Наталья Георгиевна. – Москва, 2012. – 26 с.
33. Использование метода ЯМР-спектроскопии в фармакопейном анализе С.В. Моисеев [и др.] // Ведомости НЦЭСМП. – 2016. - № 2. - С. 53-56.

34. Костригина, Е.Д. Современный взгляд на этиопатогенез пародонтита (обзор литературы) / Е.Д. Костригина, Л.А. Зюлькина, П.В. Иванов // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2017. – № 3(43). – С. 118-128.
35. Мачарадзе, Д.Ш. Гиперчувствительность к пищевым наполнителям лекарственных препаратов / Д.Ш. Мачарадзе // Лечащий врач. – 2014. - № 1. – С. 68-75.
36. Машковский, М.Д. Лекарственные средства [Текст] / М.Д. Машковский. - М.: Новая Волна, 2014. - 1216 с.
37. Медведев, Ю.В. Определение гидроксикоричных кислот в лекарственном растительном сырье и объектах растительного происхождения / Ю.В. Медведев, О.И. Передеряев, А.П. Арзамасцев [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2010. – № 3. – С. 25-31.
38. МУК 4.2.3143-13 «Определение антибиотической активности ферментных препаратов микробного (бактериального и грибного) происхождения, предназначенных для использования в пищевой промышленности».
39. Нейман, П.Л. Получение и стандартизация стоматологических гелей и жидких лекарственных средств на основе корневища и корней хрена обыкновенного и бутонов гвоздичного дерева : автореф. дисс. ... канд. фарм. наук. / Нейман Полина Леонидовна. - Первый моск. гос. ун-т им. И.М. Сеченова. М., 2011. – 28 с.
40. Нестерова, О.В. Изучение сухого остатка экстрактов травы золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) / О.В. Нестерова, Ф.Ш. Сулейманова, А.А. Матюшин // Материалы республиканской науч.-практ. конф. «Фармация: наука, образование, инновации и производство» (с международным участием) - Ташкент: Ташкент, 2017, - С. 153-154.

41. Нестерова, О.В. Количественное определение полисахаридов в траве золотарника канадского спектрофотометрическим и гравиметрическим методами / О.В. Нестерова, Ф.Ш. Сулейманова // Достижения вузовской науки 2018: сборник статей IV Международного научно-исследовательского конкурса – Пенза: МЦНС «Наука и Просвещение», 2018, - С. 192-194.
42. Нестерова О.В. Предварительное изучение экстрактов золотарника методом ¹³C ЯМР-спектроскопии / Нестерова О.В., Сулейманова Ф.Ш., Прокопов А.А., Привалов В.И. // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2018, № 4 (22), С. 9-14.
43. Новый взгляд на проблему профилактики и лечения заболеваний пародонта / О.О. Новиков [и др.] // Новый результат. – 2016. - Т. 2, №3. – С. 64-69.
44. Общая химия. Биофизическая химия. Химия биогенных элементов / Ю.А. Ершов [и др.] ; под ред. Ю.А. Ершова. - М.: Высшая школа, 1993. - 560 с.
45. Павлова, Л. В. Экстракционно-хроматографическое определение физиологически-активных компонентов цветов «ромашки аптечной» и листьев «эвкалипта прутовидного»: автореф. дисс. ... канд. хим. наук./Павлова Лариса Викторовна. – Воронеж, 2015. – 18 с.
46. Петрушевский, В.В., Гладких В.Г., Винокурова Е.В. БАВ пищевых продуктов: справочник [Текст] / В.В. Петрушевский, В.Г. Гладких, Е.В. Винокурова. - Киев: Урожай, 1992. - 192 с.
47. Пещанская, Е.В. Продуктивность *Solidago canadensis* L. (Asteraceae) в условиях Ставропольской возвышенности / Е.В. Пещанская // Бюллетень Ботанического сада Саратовского государственного университета. - 2012. - №12. - С. 85-89.
48. Побожьева, Л.В. Роль биопленки в патогенезе воспалительных заболеваний полости рта и способы ее устранения / Л.В. Побожьева, И.С. Копецкий // Лечебное дело. – 2012. – № 2. – С. 9-13.

49. Почему растения лечат / М.Я. Ловкова [и др.]. - М.: Наука, 1989. 252 с. 50.
50. Прокопов А.А. Спектроскопическое профилирование экстрактов золотарника методом ЯМР [Текст] / А.А. Прокопов, Ф.Ш. Сулейманова, В.И. Привалов, О.В. Нестерова // Биохимия в медицинской практике. Сб. науч. трудов, посвященный 75-летию кафедры биологической химии МГМСУ им. А.И. Евдокимова. – М.: Из-во МГМСУ. – 2019. – С. 65-68.
51. Пронченко, Г.Е. Лекарственные растительные средства. Справочник [Текст] / Г.Е. Пронченко - М.: Гэотар Медицина, 2002. - 288 с.
52. Пухлик, Б.М. Лекарственная аллергия и побочные эффекты лекарственных средств в аллергологии / Б.М. Пухлик, А.П. Викторов, С.В. Зайков. - Львов: Медицина свиту, 2008. - 29-30 с.
53. Савченко, Л.Н. Получение экстракционного препарата противовоспалительного и мочегонного действия из травы золотарника канадского / Л.Н. Савченко, Т.Ф. Маринина, В.А. Карпенко // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2016. – Т. 18, № 2. – С. 195-198.
54. Самылина, И.А. Фармакогностическое изучение лекарственного растительного сырья – основа создания ОФС и ФС для Государственной Фармакопеи Российской Федерации XIII издания / И.А. Самылина, В.А. Куркин, Г.П. Яковлев // Сеченовский вестник, 2016, 1, 3-5.
55. Семенихин, В.И. Оптимизация агротехнологии получения промышленных плантаций золотарника канадского при совместных посевах с однолетними сельскохозяйственными культурами и ромашкой аптечной в условиях Московской области / В.И. Семенихин, И.Д. Семенихин. // Сельскохозяйственная биология. – 2009. - № 1. - С. 99-105.
56. Сильверстейн Р. Спектрометрическая идентификация органических соединений [Текст] / Р. Сильверстейн, Ф. Вебстер, Д. Кимл. - М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. - 557 с.
57. Скальный, А.В. Биоэлементы в медицине [Текст] / А.В. Скальный, И.А. Рудаков. - М.: ОНИКС 21 век: Мир, 2004. - 272 с.

58. Скальный, В.Э. Химические элементы в физиологии и экологии человека [Текст] / В.Э. Скальный. - М.: ОНИКС 21 век: Мир, 2004. - 216 с.
59. Современные методы в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта: монография [Текст] / О.А. Гуляева, Р.Т. Буляков, Л.П. Герасимова [и др.]. - Уфа: Изд-во «УралПолиграфСнаб», 2016. - 190 с.
60. Сонова, К.В. Использование Золотарника в современной медицине / К.В. Сонова // Научный медицинский вестник. - 2015. - № 2 (2). - С.61-67.
61. Состояние тканей пародонта и системы «Перекисное окисление липидов - антиоксидантная защита» в слюне и десневой жидкости у работников производства нефтехимии / Р.И. Сабитова [и др.] // Казанский медицинский журнал. - 2015. - Т. 96, № 5. - С. 759-763.
62. Субанова, А.А. Фитотерапия в стоматологии / А.А. Субанова // Вестник КРСУ. - 2016. - Т. 16, № 3. - С. 190-194.
63. Сулейманова, Ф.Ш. Анализ фитохимических свойств травы золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) / Ф.Ш. Сулейманова, О.В. Нестерова, А.А. Матюшин // Сб. ст. V науч.-практ. конф. «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (15 марта 2017 г.). - 2017. - С. 203-205.
64. Сулейманова, Ф.Ш. Изучение технологических параметров и числовых показателей качества сырья травы золотарника канадского (*S. canadensis* L.) / Ф.Ш. Сулейманова, О.В. Нестерова, А.А. Матюшин // Сеченовский вестник. - 2018. - №3 (33). - С. 64-68.
65. Сулейманова, Ф.Ш. Исторический опыт и перспективы использования травы золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) в медицине / Ф.Ш. Сулейманова, О.В. Нестерова, А.А. Матюшин // Здоровье и образование в XXI веке. - 2017. - Т. 19, № 4. - С. 142-149.
66. Сулейманова, Ф.Ш. Микроскопическое изучение травы золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) / Ф.Ш. Сулейманова, О.В. Нестерова, А.А. Матюшин // Сеченовский вестник. - 2017. - №3 (29). - С. 57-64.

67. Сулейманова, Ф.Ш. Определение дубильных веществ в траве золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) / Ф.Ш. Сулейманова // Журнал научных статей «Здоровье и образование в XXI веке». – 2017. – Т. 19, № 12. - С. 302-306.
68. Сулейманова Ф.Ш. Определение элементного состава золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) и золотарника карликового (*Solidago pappi* Nutt.) с использованием РФА-ЭД [Текст] / Сулейманова Ф.Ш., Нестерова О.В., Аверцева И.Н., Решетняк В.Ю. // Химическая технология. – 2019; № 2, С. 82-86.
69. Сулейманова Ф.Ш. Разработка и валидация методики количественного определения фенолкарбоновых (гидроксикоричных) кислот в траве золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) / Сулейманова Ф.Ш., Нестерова О.В.; Аверцева И.Н., Решетняк В.Ю. // Химическая технология. – 2019; № 6, С. 252-256. DOI: 10.31044/1684-5811-2019-20-6-252-256
70. Сулейманова, Ф.Ш. Сравнительная характеристика фитопрепаратов, используемых для лечения и профилактики заболеваний пародонта, и перспективы использования пленок с экстрактом золотарника / Ф.Ш. Сулейманова, О.В. Нестерова // Сб. науч. трудов междунар. науч. конф. «Перспективы лекарственного растениеводства» (1-2 ноября 2018 г.). – М.: ВИЛАР. 2018. – С. 58-63.
71. Сулейманова, Ф.Ш. Фитохимические реакции на дубильные вещества травы золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) / Ф.Ш. Сулейманова, О.В. Нестерова, А.А. Матюшин // Сб. мат. XXIV Российского национального конгресса «Человек и лекарство» (10–13 апреля 2017 г.). Тезисы докладов. – М.: Видокс, 2016. - С. 173.
72. Сумина, Е.Г. Тонкослойная хроматография. Теоретические основы и практическое применение / Е.Г.Сумина, С.Н.Штыков, Н.В.Тюрина – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 2002. – 102 с.

73. Тохтабаева, Г.М. Усовершенствование методики количественного определения суммы флавоноидов в траве золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) / Г.М. Тохтабаева, С.Л. Баслинов, И.Е. Копылова [и др.] // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – № 10. – С. 4-8.
74. Федотова В.В. Фармакогностическое изучение золотарника кавказского (*Solidago caucasica* Kem.-Nath.) : дис. канд.фарм. наук. Пятигорский медико-фармацевтический институт, Пятигорск, 2014.
75. Федотова, В.В. Виды рода золотарник (*Solidago*): значение для медицинской практики, перспективы изучения / В.В. Федотова, В.А. Челомбитько // Научные ведомости. – 2012. – № 16 (135). Вып. 19. – С. 136-145.
76. Федотова, В.В. Фенольные соединения и антибактериальное действие сухого экстракта золотарника кавказского (*Solidago caucasica* Kem.-Nath.) / В.В. Федотова, В.А. Челомбитько, Н.В. Постникова // Медицинский альманах. – 2013. – № 1 (25). – С. 185-188.
77. Флора европейской части СССР [Текст] / Отв. ред. Н.Н. Цвелёв. – СПб.: Наука, 1994. Т.7. – 317 с.
78. ФС 42-2777-91. Фармакопейная статья «Трава золотарника канадского».
79. Химический анализ лекарственных растений / Е.Я. Ладыгина [и др.] ; под ред. Н.И. Гринкевич. - М.: Высшая школа, 1983. - 176 с.
80. Электронный ресурс https://www.rlsnet.ru/index_encyclopaedia.htm. [Дата обращения 13.06.2018]
81. Энциклопедический словарь лекарственных растений и продуктов животного происхождения: учеб. пособие / под. ред. Г.П. Яковлева, К.Ф. Блиновой. – СПб. : Специальная литература, 1999. – 408 с.
82. Apati, P. Herbal remedies of *Solidago* – correlation of phytochemical characteristics and antioxidative properties / P. Apati, K. Szentmihalyi, Sz.T. Kristo [et al.] // J. Pharm. Biomed. Anal. – 2003. – Vol. 32, No. 4-5. – PP. 1045-1053.

83. Apati, P. HPLC Analysis of the flavonoids in pharmaceutical preparations from Canadian goldenrod (*Solidago canadensis*) / P. Apati, K. Szentmihalyi, A. Balazs [et al.] // *Chromatographia*. – 2002. – Vol. 56, No. 1 – PP. 65-68.
84. Avertseva I.N. Study of Polyphenolic Compounds in Extracts from Flowers and Leaves of Canadian Goldenrod and Dwarf Goldenrod (*Solidago canadensis* L. and *Solidago nana* Nitt.) / Avertseva I.N., Suleymanova F.Sh., Nesterova O.V., Reshetnyak V.Yu., Matveenko V.N., Zhukov P.A. // *Moscow University Chemistry Bulletin*. – 2020; Vol. 75, PP. 47–51 DOI: 10.3103/S0027131420010034 (WoS, Scopus)
85. Brand-Williams, W., C.E. Cuvelier, C. Berset. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity // *Food Sci. Technol.* – 1995. - № 28. – P. 25-30.
86. Bondent, V.W. Brand-Williams, C. Berset. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method // *Food Sci. Technol.* - 1997. - № 30. – P. 609-615
87. *British Pharmacopoeia*. – London, 2009. – Vol. 1
88. Brock, G.R. Local and systemic total antioxidant capacity in periodontitis and health / G.R. Brock, C.J. Butterworth, J.B. Matthews [et al.] // *J. Clin. Periodontol.* – 2004. – Vol. 31, No. 7. – PP. 515-521.
89. Cai, Y. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer / Y. Cai, Q. Luo, M. Sun [et al.] // *Life Sci.* – 2004. – Vol. 74, No. 17. – PP. 2157-2184.
90. Çalışkan, M. The Metabolism of Oxalic Acid / M. Çalışkan // *Turk. J. Zool.* – 2000. – Vol. 24, No. 1. – PP. 103-106.
91. Candan, F. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *Millefolium* Afan. (Asteraceae) / F. Candan, M. Unlu, B. Tepe [et al] // *J. Ethnopharmacol.* – 2003. – Vol. 87, No. 2-3. – PP. 215-220.
92. Casimir, C. Food lipids: chemistry, nutrition and biotechnology / Casimir, C. Akoh, David B. Min (ed) – 2nd ed. – New York: Marcel Dekker, Inc, 2002. – 1014 pp.

93. Csupor-Loffler, B. Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* s.l. on cultured human tumour cell lines / B. Csupor-Loffler, Z. Hajdu, I. Zupko [et al.] // *Phytother. Res.* – 2009. – Vol. 23. – PP. 672-676.
94. D'Aiuto, F. Periodontitis and systemic inflammation: control of the local infection is associated with a reduction in serum inflammatory markers / F. D'Aiuto, M. Parkar, G. Andreou [et al.] // *J. Dent. Res.* – 2004. – Vol. 83, No. 2. – PP. 156-160.
95. Daly, C.G. Anti-bacterial effect of citric acid treatment of periodontally diseased root surfaces in vitro / C.G. Daly // *J. Clin Periodontol.* – 1982. – Vol. 9, No. 5. – PP. 386-392.
96. Deng, Y. Polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of leaf and bark extracts of *Solidago canadensis* L. / Y. Deng, Y. Zhao, O. Padilla-Zakour [et al.] // *Industrial Crops and Products.* – 2015. – Vol. 15. – PP. 803-809.
97. DeStefano, F. Dental disease and risk of coronary heart disease and mortality / F. DeStefano, R.F. Anda, H.S. Kahn [et al.] // *BMJ.* – 1993. – No. 306(6879). – PP. 688-691.
98. Douglas M.F. Souza. Anatomical, phytochemical and histochemical study of *Solidago chilensis* Meyen / Douglas M.F. de Souza, Rafaela D. Sa, E.L. Arujo [et al.] // *An. Acad. Bras. Ciênc.* – 2018. – Vol. 90, No. 2, Suppl. 1. – PP. 2107-2120.
99. Eke, P.I. Prevalence of periodontitis in adults in the United States: 2009 and 2010 / P.I. Eke, B.A. Dye, L. Wei [et al.] // *J. Dent. Res.* – 2012. – Vol. 91, No. 10. – PP. 914-920.
100. European Pharmacopoeia 8.0 – EDQM, Strasbourg, 2015. 1264-1265.
101. Frey, F.M. Antibacterial activity of traditional medicinal plants used by Haudenosaunee peoples of New York State / F.M. Frey, R. Meyers // *BMC Complement Altern Med.* – 2010. Vol. 10, No. 64.

102. Goldberg, I. Organic acids: old metabolites, new themes / I. Goldberg, J.S. Rokem, O. Pines // *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. – 2006. Vol. 81, No. 10. – PP. 1601-11.
103. Guentsch, A. Preshaw PM, Bremer-Streck S, Klinger G, Glockmann E, Sigusch BW. Lipid peroxidation and antioxidant activity in saliva of periodontitis: effect of smoking and periodontal treatment / A. Guentsch, P.M. Preshaw, S. Bremer-Streck [et al.] // *Clin. Oral Investig.* – 2008. – Vol. 12, No. 4. – PP. 345-352.
104. Gülçin, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid) / I. Gülçin // *Toxicology*. – 2006. – Vol. 217, No. 2-3. – PP. 213-20.
105. Hung, T.M. Antioxidant activity of caffeoyl quinic acid derivatives from the roots of *Dipsacus asper* Wall / T.M Hung, M. Na, P.T. Thuong [et al.] // *J. Ethnopharmacol.* – 2006. – Vol. 108, No. 2. – PP. 188-192.
106. Iwashina, T. The structure and distribution of the flavonoids in plants / T. Iwashina // *J. Plant Res.* – 2000. – Vol. 113, No. 3. – PP. 287-299.
107. Jaafar, N.S. Hamad MN, Abbas IS, Jaafar IS. Qualitative phytochemical comparsion between flavonoids and phenolic acids contents of leaves and fruits of *Melia azedarach* (Family: Meliaceae) cultivated in Iraq by HPLC and HPTLC / N.S Jaafar, M.N. Hamad, I.S. Abbas // *Int J Pharm Pharm Sci.* – 2016. Vol. 8, No. 10. – PP. 242-250.
108. Kołodziej, B. Antibacterial and antimutagenic activity of extracts aboveground parts of three *Solidago* species: *Solidago virgaurea* L., *Solidago canadensis* L. and *Solidago gigantea* Ait. / B. Kołodziej, R. Kowalski, B. Kędzia // *Journal of Medicinal Plants Research*. – 2011, – Vol. 5, No.31. – PP. 6770-6779.
109. Kuzmenko A.N. Modification of the Quantitative Method of Flavonoid Determination in the Goldenrod Canadensis (*Solidago Canadensis*) Herb [Текст] / Kuzmenko A.N., Nesterova O.V., Suleymanova F.Sh., Matyushin A.A., Krasnyuk I.I.Jr. // *Moscow University Chemistry Bulletin*. – 2019; Vol. 74, No. 1. – PP. 38-41. DOI: 10.3103/S0027131419010061 (WoS, Scopus)

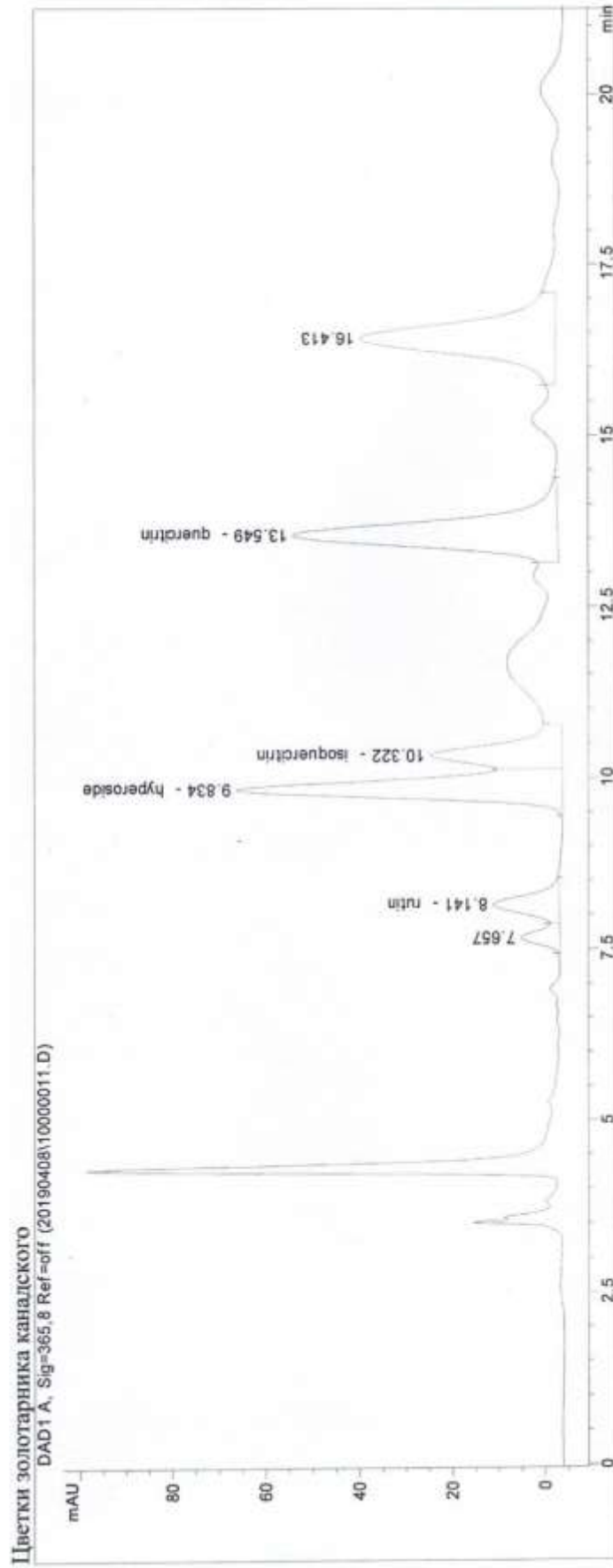
110. Lee, J. Chicoric acid: chemistry, distribution and production / J. Lee, C.F. Scagel // *Front Chem.* – 2013. – Vol. 1. – P. 40.
111. Lersten, N.R., Brubaker C.L. Paraveinal mesophyll, and its relationship to vein endings, in *Solidago canadensis* L. (Asteraceae) / N.R. Lersten, C.L. Brubaker // *Canadian Journal of Botany.* – 1989. – Vol. 67, No. 5. – PP. 1429-1433.
112. Liz, R. The anti-inflammatory modulatory role of *Solidago chinensis* Meyen in the murine model of the air pouch / R. Liz, S.V. Vigil, S. Goulart [et al.] // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2008. – Vol. 60, No. 4. – PP. 515-542.
113. McCune, L.M. Antioxidant activity in medicinal plants associated with the symptoms of diabetes mellitus used by the Indigenous Peoples of the North American boreal forest / L.M. McCune, T. Johns // *J. Ethnopharmacol.* – 2002. – Vol. 82, No. 2-3. – PP. 197-205.
114. Melzig, M.F. Goldenrod a classical exponent in the urological phytotherapy / M.F. Melzig // *Wien. Med. Wochenschr.* – 2004. Vol. 154, No. 21-22. – PP. 523-527.
115. Mishra, D. Chemical composition and antimicrobial activity of *Solidago canadensis* Linn. root essential oil / D. Mishra, S. Joshi, G. Bisht // *J. Basic Clin. Pharm.* – 2010. Vol. 1, No. 3. PP. 187-190.
116. Naveed, M. Chlorogenic acid (CGA): A pharmacological review and call for further research / M. Naveed, V. Hejazi, M. Abbas [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2018. – Vol. 97. – PP. 67-74.
117. Nollet, L.M.L. Handbook of Food Analysis / L.M.L. Nollet, F. Toldra (ed.) – Two Volume Set. – CRC Press, 2015.
118. Om, P. Sharma DPPH antioxidant assay revisited / SharmaOm P., K. Bhat Tej // *Food Chemistry.* – 2009. - Vol. 113. - PP. 1202–1205 антиоксидант
119. Pourmorad, F. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants / F. Pourmorad, S.J. Hosseinimehr, N. Shahabimajd // *African Journal of Biotechnology.* – 2006. – Vol. 5, No. 11. – PP. 1142-1145.

120. Radusiene, J. Assessment of phenolic compound accumulation in two widespread goldenrods / J. Radusiene, M. Marska, L. Ivanauskas [et al.] // *Industrial Crops and Products*. – 2015. – Vol. 63. – PP. 158-166.
121. Rekha, C. Ascorbic acid, total phenol content and antioxidant activity of fresh juices of four ripe and unripe citrus fruits / C. Rekha, G. Poornima, M. Manasa [et al.] // *Chem. Sci. Trans.* – 2012. – Vol. 1, No. 2. – PP. 303-310.
122. Russo, A. *Solidago chilensis* Meyen e *Kageneckia oblonga* Ruiz & Pav. / A. Russo, J. Garbarino // *Phytotherapie*. – 2008. – Vol. 6. – PP. 333-341.
123. Sabir, S.M. Antioxidant and hepatoprotective activity of ethanolic extract of leaves of *Solidago microglossa* containing polyphenolic compounds / S.M. Sabir, S.D. Ahmad, A. Hamid [et al.] // *Food Chemistry*. – 2012. – Vol. 131. – PP. 741-747.
124. Sato, Y. In vitro and in vivo antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid / Y. Sato, S. Itagaki, T. Kurokawa // *Int. J. Pharm.* – 2011. Vol. 403, No. 1-2. – PP. 136-138.
125. Scheie, A.A. Mechanisms of dental plaque formation / Scheie A.A. // *Adv. Dent. Res.* – 1994. – Vol. 8, No. 2. – PP. 246-253.
126. Srinivasan, M. Ferulic Acid: Therapeutic Potential Through Its Antioxidant Property / M. Srinivasan, A.R. Sudheer, V.P. Menon // *J. Clin. Biochem. Nutr.* – 2007. – Vol. 40, No. 2. – PP. 92-100.
127. Starks, C.M. Antibacterial clerodane diterpenes from Goldenrod (*Solidago virgaurea*) / C.M. Starks, R.B. Williams, M.G. Goering [et al.] // *Phytochemistry*. – 2010. – Vol. 71. – PP. 104-109.
128. Steliopoulos, P. Biosynthesis of the sesquiterpene germacrene D in *Solidago canadensis*: ¹³C and ²H labeling studies / P. Steliopoulos, M. Wüst, K.P. Adam [et al.] // *Phytochemistry*. – 2002. – Vol. 60, No. 1. – PP. 13-20.
129. Suleymanova F.Sh. Antioxidant and Antibacterial Activity of the Canadian Goldenrod Herb (*Solidago canadensis* L.) [Текст] / Suleymanova F.Sh., Nesterova O.V., Avertseva I.N., Reshetnyak V.Y., Matveenko V.N., Zhukov

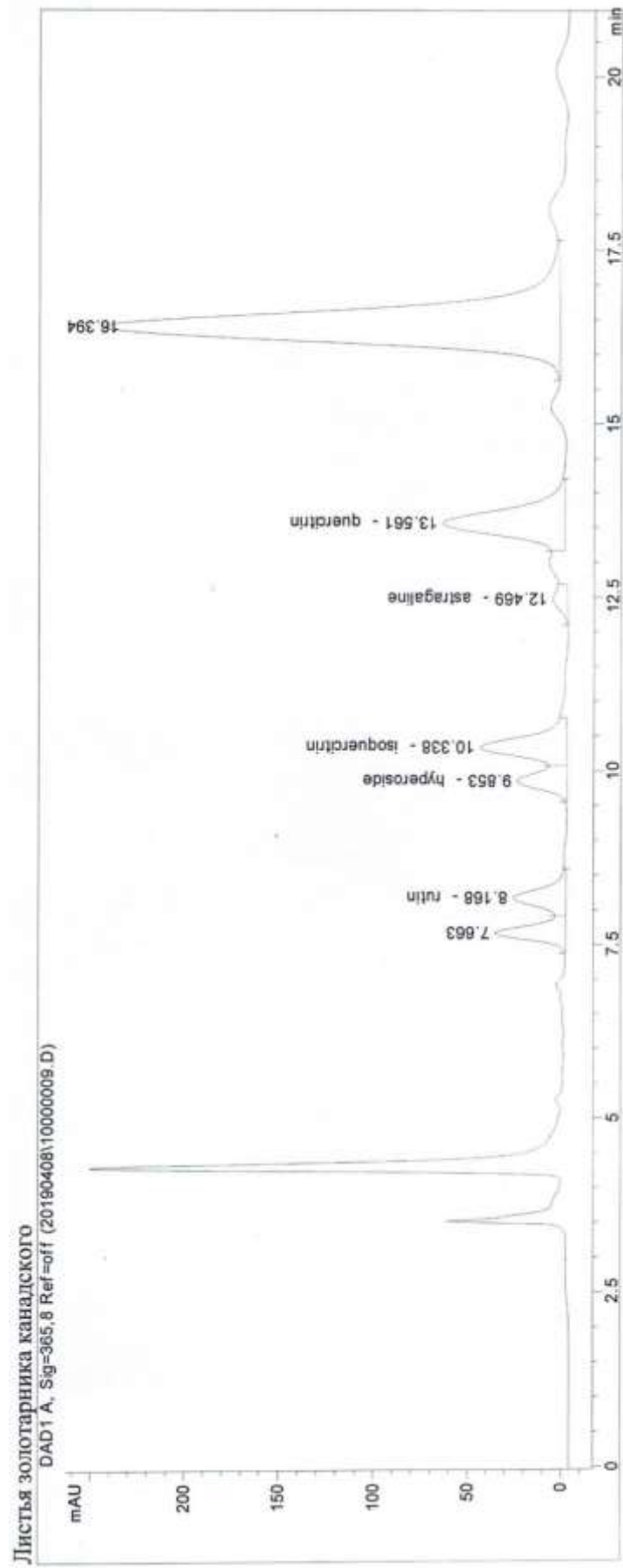
- P.A. // Moscow University Chemistry Bulletin. – 2020; Vol. 75, No. 4. – PP. 261–263. (WoS, Scopus)
130. Suleymanova, F. HPLC Quantification of hydroxycinnamic and organic acids of Canadian goldenrod (*Solidago canadensis* L) / F. Suleymanova, O. Nesterova, A. Matyushin // Pharmacogn. J. – 2019. – Vol. 19, No. 2. – PP. 400-404.
131. Šutovská, M. Characterization and biological activity of *Solidago canadensis* complex / M. Šutovská, P. Capek, M. Kocmálová [et al.] // Int. J. Biol. Macromol. – 2013. – Vol. 52. – PP. 192-197.
132. Tamura, E.K. Inhibitory effects of *Solidago chilensis* Meyen hydroalcoholic extract on acute inflammation [et al.] / E.K. Tamura, R.S. Jimenez, K. Waismam // J. Ethnopharmacol. – 2009. – Vol. 122. – PP. 478-485.
133. Thygesen, L. Antioxidant activity of cichoric acid and alkamides from *Echinacea purpurea*, alone and in combination / L. Thygesen, J. Thulin, A. Mortensen [et al.] // Food Chemistry. – 2007. – Vol. 101, No. 1. – PP. 74-81.

ПРИЛОЖЕНИЯ

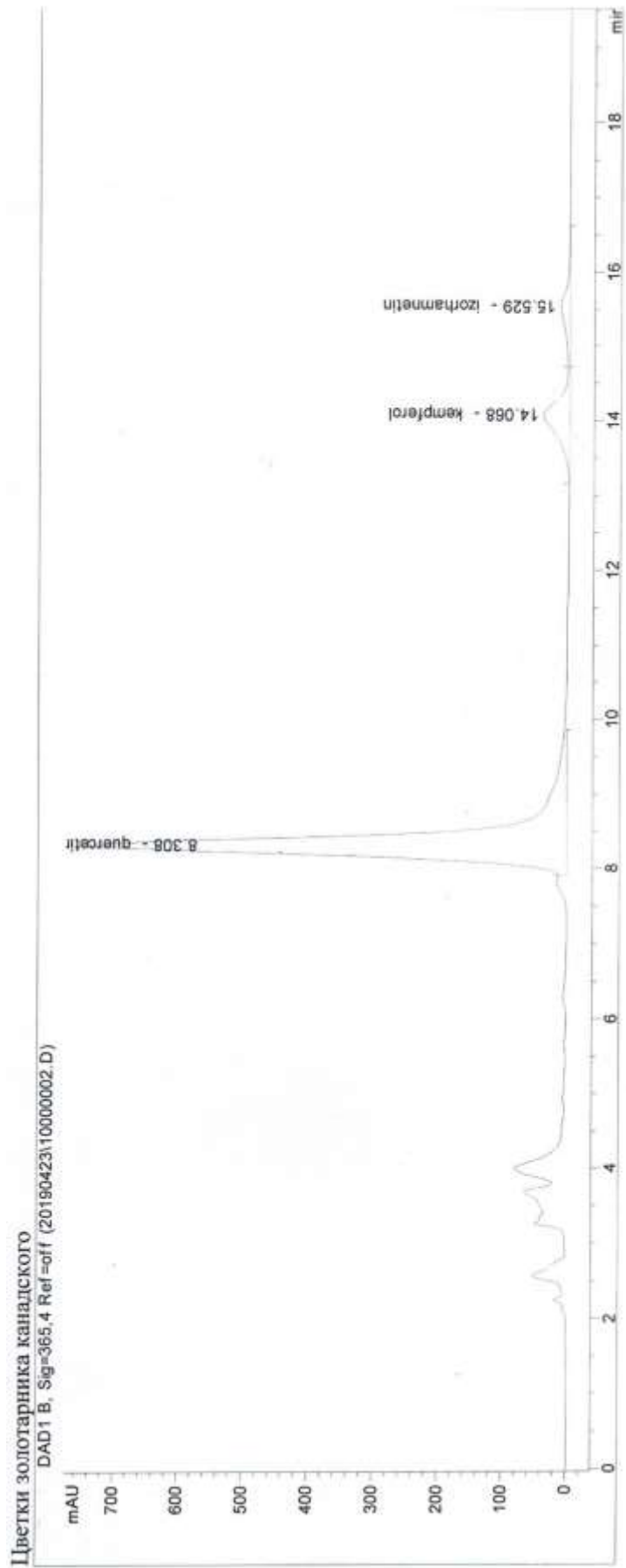
Приложение 1



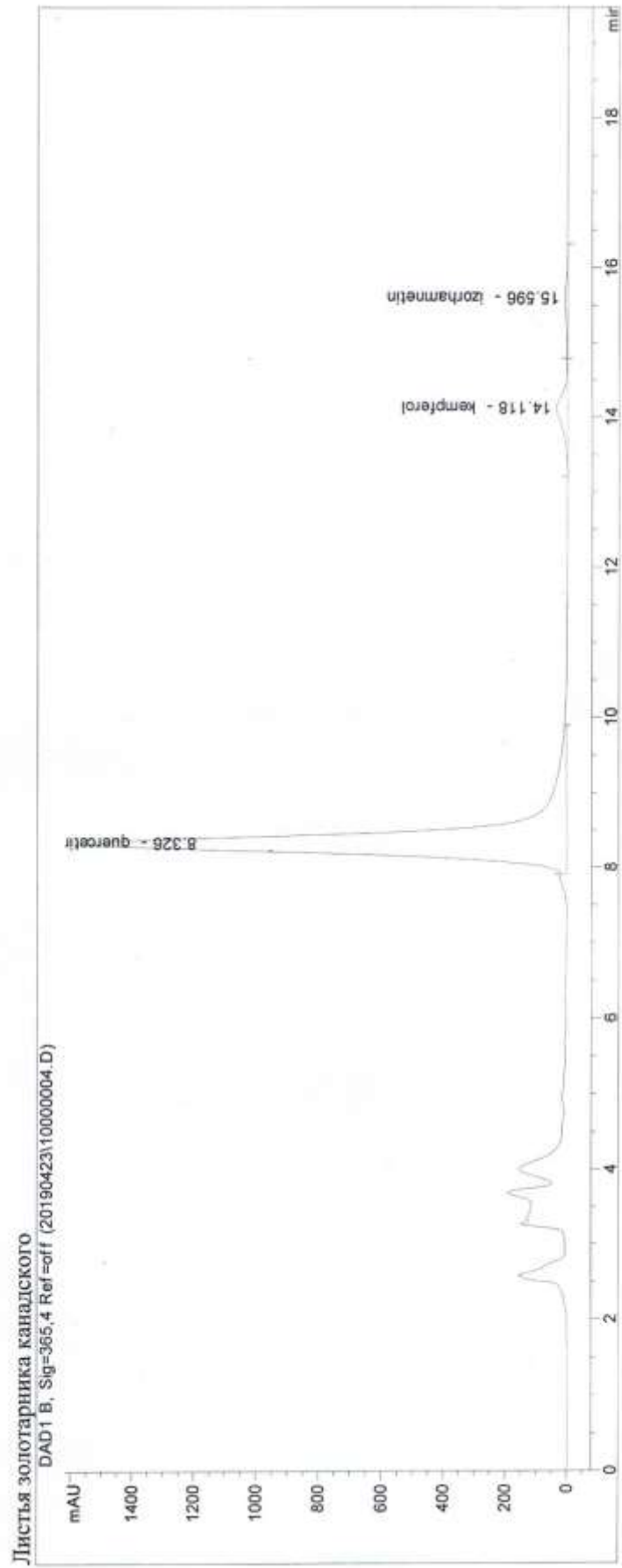
Приложение 2



Приложение 3



Приложение 4



Приложение 5

“УТВЕРЖДАЮ”

Проректор по учебной работе,
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова
Минздрава России



Литвинцова Т.М.

2020 г.

АКТ

внедрения в учебный процесс
ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет)

результатов диссертационного исследования

Сулеймановой Фидан Ширин кызы

на тему «Разработка и совершенствование методов контроля качества лекарственного растительного сырья травы золотарника канадского и определение его биологической активности» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по направлению подготовки 33.06.01 – «Фармация» (направленность подготовки 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия»).

Мы, нижеподписавшиеся, д.фарм.н., доц. зав. учебной частью каф. фармацевтического естествознания Бобкова Наталья Владимировна, к.б.н., доц., зав. каф. фармацевтического естествознания Луферов Александр Николаевич удостоверяем факт внедрения научной работы Сулеймановой Фидан Ширин кызы в учебный процесс кафедры химии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Материалы исследований используются при чтении лекций и проведении семинаров со студентами 3,4 курсов фармацевтического факультета.

Зав. каф. фармацевтического естествознания
Института фармации им. А.П. Нелюбина
ФГАОУ ВО Первый МГМУ
им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет),
к.б.н., доц.

А.Н. Луферов

Зав. учебной частью
каф. фармацевтического естествознания
Института фармации им. А.П. Нелюбина
ФГАОУ ВО Первого МГМУ
им. И.М. Сеченова Минздрава России
(Сеченовский Университет),
д.фарм.н., доц.

Н.В. Бобкова

Приложение 6


 "УТВЕРЖДАЮ"
 Лысенко П.И.
 Советник Генерального директора
 ООО «Векторфарм»

«13» октября 2020г.

А К Т

запланированного внедрения в менеджмент качества ООО «Векторфарм»
 в 2019 году результатов диссертационного исследования
 Сулеймановой Фидан Ширин кызы
 на тему «Разработка и совершенствование методов контроля качества лекарственного
 растительного сырья травы золотарника канадского и определение его биологической
 активности»

Мы, нижеподписавшиеся, члены комиссии в составе сотрудников: специалиста по
 качеству Кошелевой Ю.П., продакт-менеджера Рыжкиной Н.К. ООО «Векторфарм»
 рассмотрели материалы по разработанной методике количественного определения
 суммы флавоноидов в пересчете на рутин для контроля качества и признали
 практическую ценность разработанной методики. Мы удостоверяем, что полученные
 диссертантом результаты исследований: методика количественного определения суммы
 флавоноидов в пересчете на рутин будут внедрены в деятельность ООО «Векторфарм» в
 качестве методики для контроля качества средств, сырье которых содержит
 флавоноиды.

Члены комиссии
 Специалист по качеству ООО «Векторфарм»  Кошелева Ю.П.

Продакт-менеджер ООО «Векторфарм»  Рыжкина Н.К.

«13» октября 2020 г.

Приложение 7

Проект ФС «Золотарника канадского трава – *Solidaginis canadensis herba*»

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Золотарника канадского трава <i>Solidaginis canadensis herba</i>	Вводится взамен ФС 42-2777-91 «Трава золотарника канадского»
---	---

Настоящая фармакопейная статья распространяется на собранные в фазу цветения и высушенные траву дикорастущего или культивируемого многолетнего растения золотарника канадского, *Solidago canadensis* L., сем. Астровых – *Asteraceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Цельное сырье. Сырье травы золотарника канадского представляет собой цельное или частичное измельченные цветоносные и олиственные побеги длиной до 30 см. Стебель простой, в сечении ребристый, поверхность ребристая, слабо опушенный, листорасположение очередное. Листья простые длиной 4-7 см, шириной 1-2 см, очередные, ланцетной формы, с клиновидным основанием, острой верхушкой, с пильчатым краем, бесчерешковые. Листья неопушенные. Жилкование перистое, ярко-выражена главная жилка. Цвет с нижней стороны светло-зеленый, с верхней – зеленый. Соцветие представляет собой корзинку на ножке, собранные в изогнутые кисти. Возможно присутствие отдельных бутонов и незрелых плодов. Корзинка размером 5-7 мм состоит из ложноязычковых и трубчатых цветков и листочков обертки. Цветонос

бледно-зеленый, опушенный, гладкий. Цветки желтые (краевые - ложноязычковые и срединные - трубчатые), обоеполые. Трубчатый цветок простой, актиноморфный. Венчик состоит из пяти сросшихся лепестков. Тычинок пять. Пестик один, завязь нижняя. Длина цветка 2-3 мм. Ложноязычковый цветок простой, зигоморфный. Венчик с тремя зубчиками. Тычинки отсутствуют, пестик один. Длина цветка 2-3 мм. Листочки обертки овальной формы длиной 2 мм, шириной 0,5 мм бледно-зеленого цвета. Плод семянка с хохолками. Цвет зеленовато-желтый. Запах слабый. Вкус горьковатый.

Измельченное сырье представляет собой кусочки листьев, стеблей, соцветий, незрелых плодов. Цвет от зеленовато-желтый с белыми частями стебля. При рассмотрении измельченного сырья травы золотарника канадского под лупой (10×) отмечаются кусочки листьев зеленого цвета, стеблей зеленовато-белого цвета, соцветия корзинки, желтые цветки, листочки обертки. Запах слабый. Вкус горьковатый.

Порошок представляет собой кусочки стеблей, листьев, соцветий, незрелые плоды и их части. При рассмотрении под лупой (10×) можно отметить кусочки цветоносов и стеблей, чаще в продольном сечении, беловатого цвета, снаружи – от светло-зеленого до коричневого цвета; кусочки листьев от светло-зеленого до зеленого цвета; части бутонов желтого цвета; лепестки, их кусочки желтого цвета (можно отметить трубчатые и язычковые цветки); отдельные листочки обертки светло-зеленого цвета, изредка – незрелые плоды коричневого цвета с белым хохолком. Цвет порошка зеленый с белыми и желтыми вкраплениями. Запах слабый, своеобразный, вкус горьковатый.

Микроскопические признаки.

Листья. Клетки верхнего эпидермиса листа представлены полигональными с слабоизвилистыми стенками, с нижней стороны листа клетки эпидермиса извилистые. С обеих сторон клетки эпидермиса со складчатой кутикулой с бурым содержимым в клетках, с равномерным

утолщением стенок. Над главной жилкой клетки эпидермиса полигональные, неизвилистые, над мелкими жилками клетки эпидермиса прямые, вытянутые. Устьичный комплекс аномоцитный: замыкающие клетки окружены 4-5 околоустьичными клетками. Клетки устьиц округлые. На нижней стороне листа устьиц больше (2700 1 мм^2), чем на верхней (2000 1 мм^2). Размер устьиц с нижней стороны $12 \times 14 \text{ мкм}$, с верхней $10 \times 11 \text{ мкм}$, над жилкой $5 \times 6 \text{ мкм}$. Устьица не погружены в эпидермис. На краю листа имеются многоклеточные простые волоски из толстостенных клеток с бурым содержимым. На поверхности эпидермиса имеются простые многоклеточные тонкостенные волоски, у некоторых простых волосков верхняя клетка со спадающимися стенками (в некоторых случаях верхняя клетка отваливается). Основание волосков окружено розеткой клеток эпидермиса (5-7 клеток). Под эпидермисом встречаются схизогенные вместилища округлой и вытянутой формы с зеленовато-бурым содержимым, которые окрашиваются суданом III в оранжевый цвет. Также в листьях золотарника обнаруживаются в большом количестве капли каротиноидов желто-золотистого цвета, которые также окрашиваются суданом III в оранжевый цвет.

Стебель. При рассмотрении препарата стебля с поверхности эпидермис стебля состоит из полигональных неизвилистых клеток, устьичный комплекс аномоцитного типа (длиной $10-12 \text{ мкм}$, шириной $10-14 \text{ мкм}$). Также на эпидермисе располагаются толстостенные многоклеточные волоски и тонкостенные простые многоклеточные волоски, верхняя клетка которых со спадающимися клетками.

При рассмотрении продольного среза стебля отмечены сосуды со спиральным и лестничным утолщением в диаметре $6-40 \text{ мкм}$.

На поперечном срезе стебель имеет пучковое строение (рис. 5). Покровная ткань представлена эпидермисом – один ряд клеток прямоугольной формы. Под эпидермисом располагается колленхима. Проводящая система представлена крупными открытыми коллатеральными сосудисто-волокнистыми пучками. Над сосудисто-волокнистыми пучками

располагается механическая ткань - перциклическая склеренхима, а между пучками – межпучковая склеренхима. Сердцевина представлена основной паренхимой.

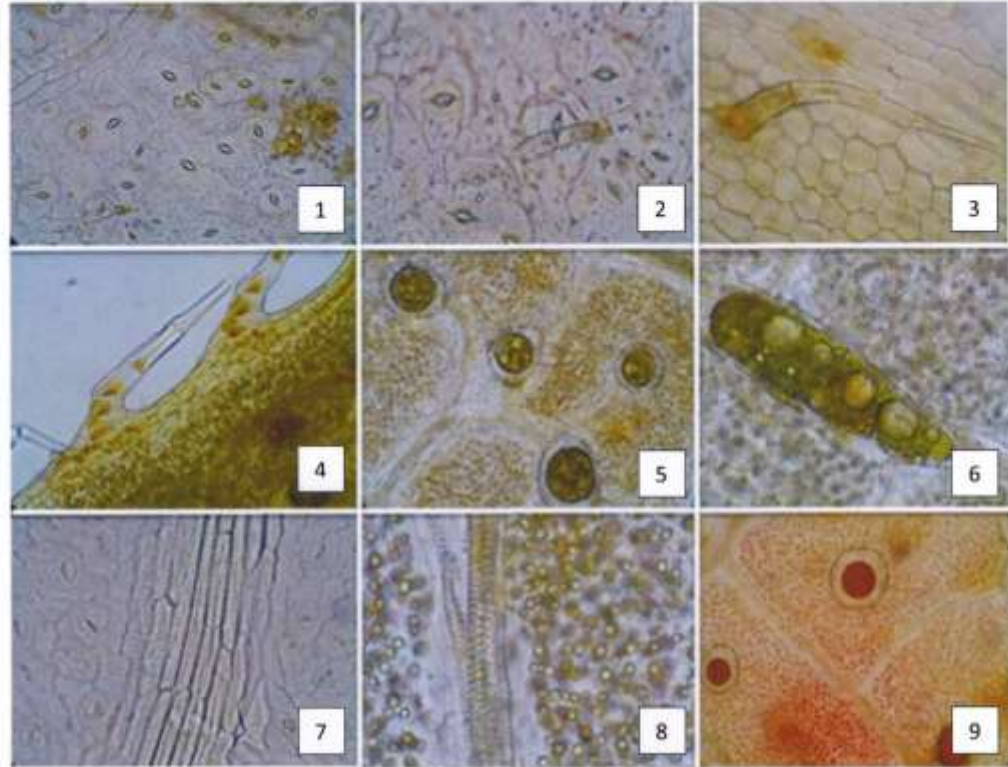


Рис. 1. Микроскопия листа золотарника канадского

1 – нижний эпидермис листа (ув. x200), 2 – верхний эпидермис листа с простым многоклеточным тонкостенным волоском (ув. x400), 3 – простой многоклеточный волосок (ув. x200), 4 – край листа (простой многоклеточный волосок) (ув. x200), 5 – вместилища листа (ув. x200), 6 – вместилища листа (ув. x400), 7 – эпидермис над жилкой (ув. x200), 8 – жилка листа (ув. x400), 9 – окрашивание листа суданом III (ув. x200)

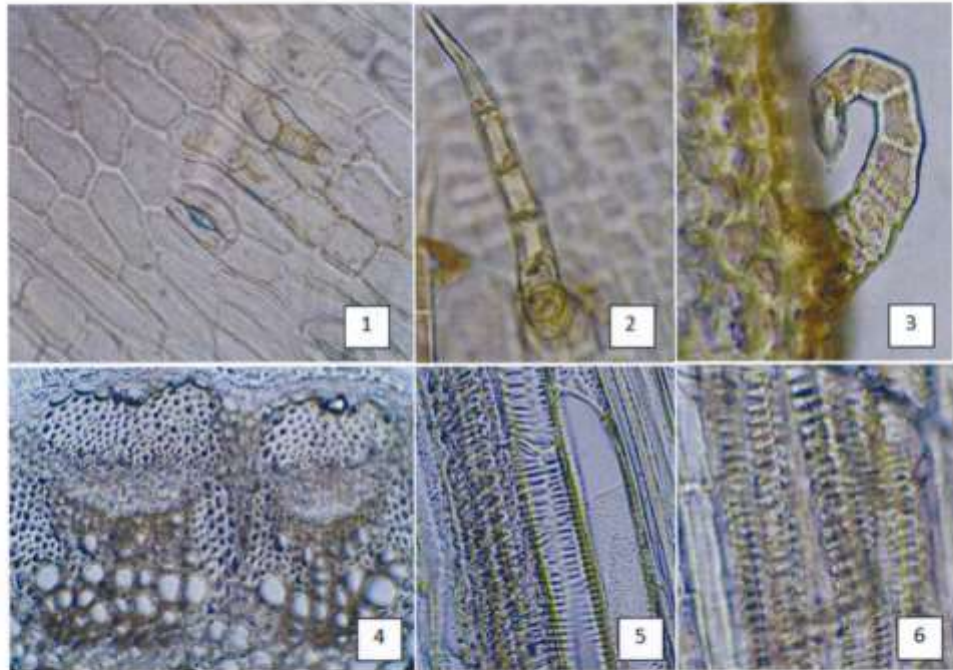


Рис. 2. Микроскопия стебля золотарника канадского

1 – эпидермис стебля (ув. $\times 200$), 2 – эпидермис стебля (ув. $\times 400$), 3 – поперечный срез стебля (ув. $\times 200$), 4 – поперечный срез стебля, сосудисто-волокнистые пучки (ув. $\times 200$), 5 – продольный срез стебля сосуды, спирального и лестничного типа (ув. $\times 200$), 6 – продольный срез стебля, сосуды спирального (ув. $\times 200$).

Соцветие. Листочек обертки имеет эпидермис с полигональными клетками на нижнем и верхнем эпидермисе, простые многоклеточные волоски в верхней части листочка обертки, сросшиеся волоски по краю листа. Устьичный комплекс аномоцитного типа, устьица погружены в эпидермис. Также как и в листе имеются капли каротиноидов и схизогенные вместилища по центру листочка обертки, окрашиваемые суданом III в оранжевый цвет. Проводящая система представлена трахеидами вдоль листочка обертки.

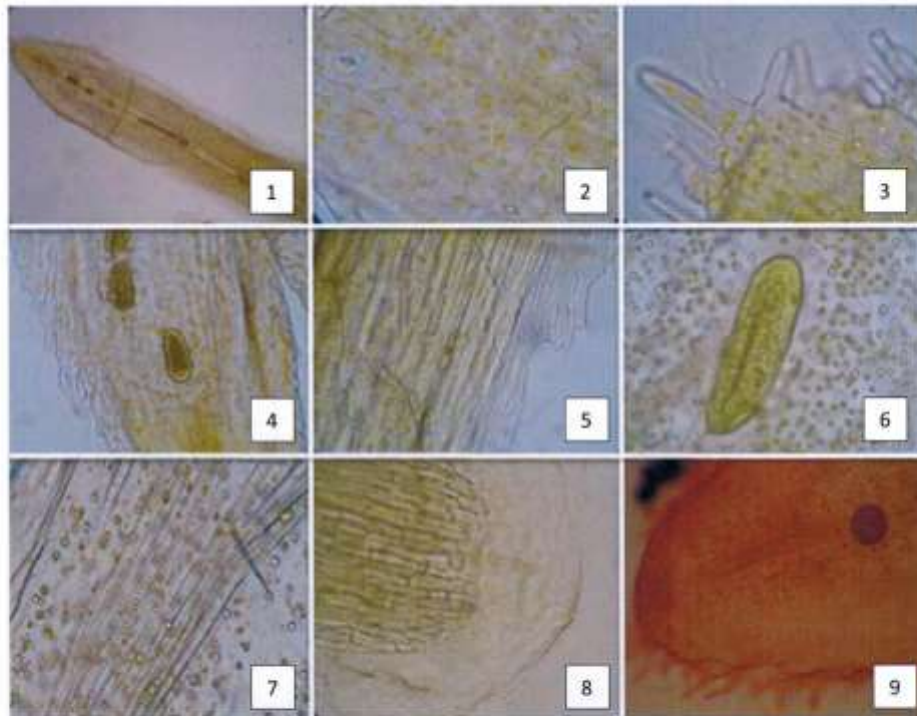


Рис. 3. Микроскопия обертки соцветия золотарника канадского

1 – обертка (ув. $\times 40$), 2 – эпидермис обертки (ув. 400), 3 – волоски обертки (ув. $\times 400$), 4 – вместилища обертки (ув. $\times 200$), 5 – край листочка обертки, сросшиеся волоски (ув. $\times 400$), 6 – вместилище обертки и включения эфирного масла (ув. $\times 400$), 7 – жилка обертки (ув. $\times 400$), 8 – нижняя часть обертки (ув. $\times 400$), 9 – окрашивание суданом III (ув. $\times 200$).

Эпидермис ложноязычковых цветков состоит из прямоугольных клеток. Устьиц не наблюдалось. Клетки лепестков содержат многочисленные капли каротиноидов желто-золотистого цвета, окрашиваемые суданом III в оранжевый цвет. Края клеток ровные, неизвилистые. Хохлатки двойные и сросшиеся. Длина 170 мкм, ширина 40 мкм. У основания цветка имеются 2 извилистые жилки. Иногда обнаруживается плод – семянка с одноклеточными волосками и вместилищами, которые при окрашивании суданом III становятся оранжевого цвета.

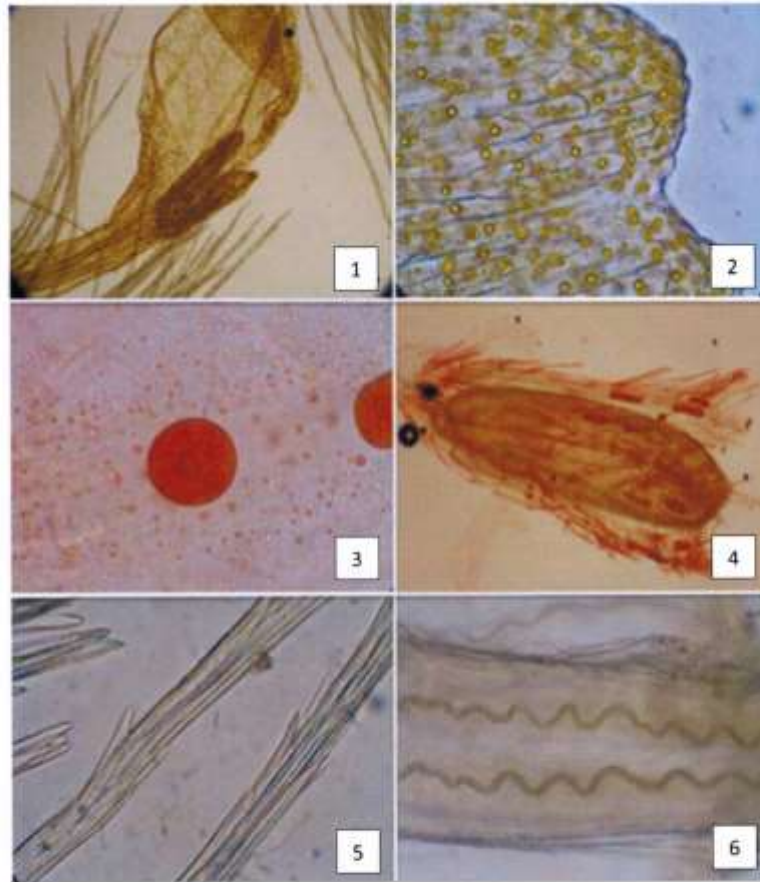


Рис. 4. Микроскопия ложноязычкового цветка золотарника канадского

1 – ложноязычковый цветок (ув. х40), 2 – эпидермис лепестка (ув. х400), 3 – эпидермис обертки после окрашивания суданом III (ув. х200), 4 – плод – семянка после окрашивания суданом III (ув. х200), 5 – сросшиеся хохлатки (ув. 400), 6 – спирально закрученные жилки (ув. х200).

Трубчатые цветки имеют клетки эпидермиса различной формы (от округлых до многоугольных и вытянутых) с равномерным утолщением клеток (рис. 8). Устьица не обнаружены. Вдоль краев лепестков располагаются схизогенные вместилища с зеленоватым содержимым. Каждый цветок имеет 5 тычинок и 2 пестика с сосочковидными выростами. У основания цветка имеются 5 пар спирально-закрученных жилок. При

окрашивании суданом III, вместилища и капли окрашиваются в оранжевый цвет.

Встречается пыльца округлой формы 8-10 мкм, с шиповатым краем.

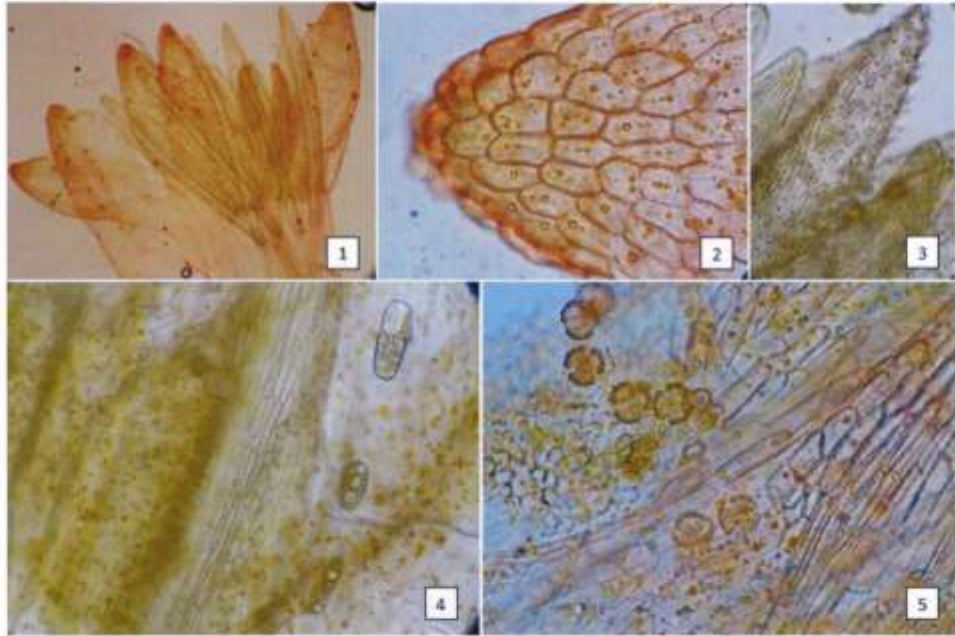


Рис. 5. Микроскопия трубчатого цветка

1 – микропрепарат трубчатого цветка после окрашивания суданом III (ув. x40), 2 - эпидермис лепестка после окрашивания суданом III (ув. x400), 3 – сосочковидные выросты пестика (ув. x200), 4 – схизогенные вместилища (ув. x200), 5 – пыльца (ув. x200).

Порошок. В результате микроскопического исследования порошка травы золотарника были обнаружены фрагменты листовых пластинок, стебля, листочков обертки, цветков, проводящей системы, характерные особенности анатомического строения которых описаны выше.

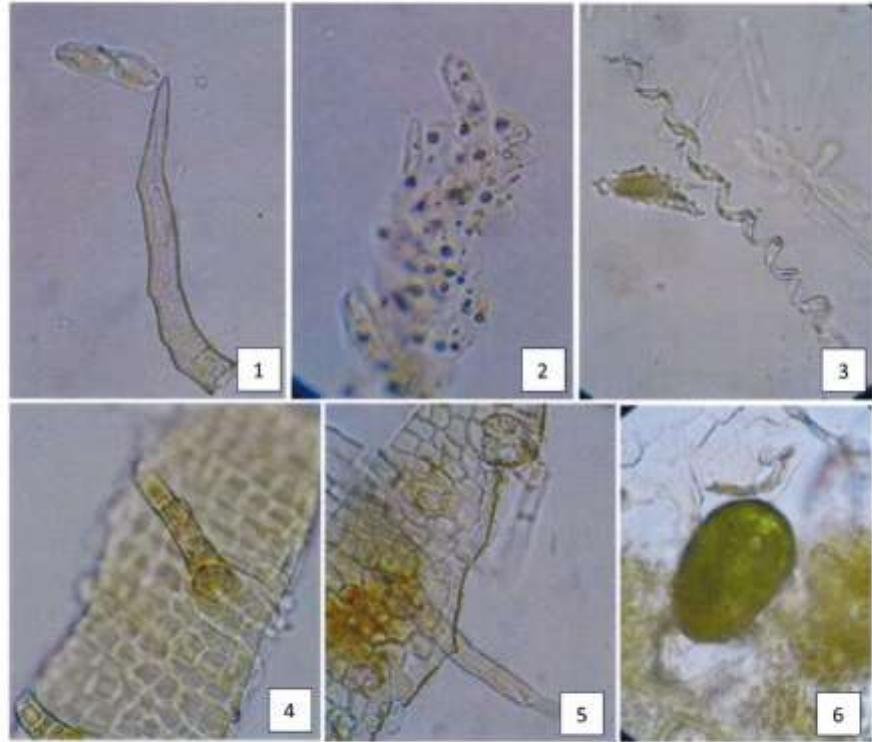


Рис. 6. Микроскопия измельченного сырья *S. canadensis* L. (увел.*400)

1 - простой волосок листа; 2 - эпидермис венчика; 3 - спиральный сосуд ксилемы; 4 - эпидермис стебля; 5 - эпидермис листа; 6 - схизогенное вместилище листа.

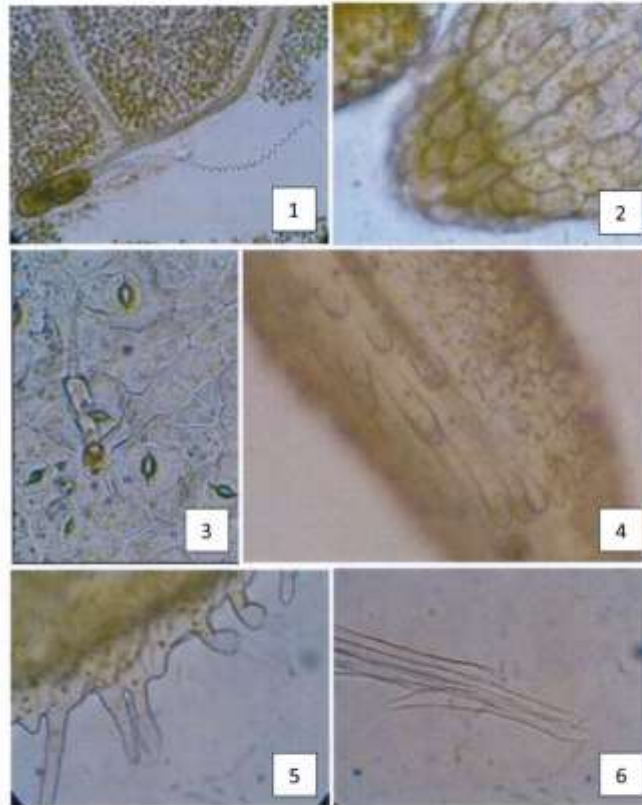


Рис. 7. Микроскопия порошка *S. canadensis* L.

1 – эпидермис листа с поверхности (увел.*200); 2 – эпидермис венчика трубчатого цветка (увел.*400); 3 - устьичный аппарат, простой тонкостенный волосок со спадающимися стенками верхней клетки (увел.*400); 4 – сосочковидные выросты (увел.*400); 5 – край листочка обертки с волосками (увел.*400), 6 – хохлатки плода.

Определение основных групп биологически активных веществ

1. Тонкослойная хроматография

Приготовление растворов.

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,005 г СО рутин (рутин тригидрата) растворяют в 10 мл спирта 96 % и перемешивают. Срок годности раствора не более 3 мес при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Около 1,0 г измельченного сырья до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл спирта 96 % и нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане до кипения. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор). Система растворителей для подвижной фазы

На линию старта хроматографической пластинки со слоем силикагеля на полимерной подложке размером 10 × 10 см наносят 10 мкл испытуемого раствора и рядом 5 мкл раствора СО рутин. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре, помещают в камеру, предварительно насыщенную в течение не менее 60 мин смесью растворителей этилацетат : ледяная уксусная кислота : вода (7,5:1,5:1,5) и хроматографируют восходящим способом. После прохождения фронтом растворителей не менее 80 – 90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителей. Пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться 2 зоны адсорбции с оранжевого или желтого цвета на уровне зоны на хроматограмме раствора СО рутин и выше зоны рутин, 2 зоны адсорбции с желтого или желтовато-коричневого цвета выше зоны рутин; допускается обнаружение других зон адсорбции.

2. Фитохимические реакции

Около 1,0 г измельченного сырья кипятят в течение 2 – 3 мин с 20 мл воды, охлаждают и фильтруют через бумажный фильтр. К 2 мл фильтрата прибавляют 2 мл железа(III) аммония сульфата раствора 10 %; должно наблюдаться черно-зеленое окрашивание (дубильные вещества).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. Цельное сырье, измельченное сырье, порошок – не более 13 %.

Зола общая. Цельное сырье, измельченное сырье, порошок – не более

8 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. Цельное сырье, измельченное сырье, порошок – не более 1 %.

Измельченность сырья. Цельное сырье: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, — не более 5 %. Измельченное сырье: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, – не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм, – не более 5 %. Порошок: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, – не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм, – не более 5 %.

Посторонние примеси. Сырье, изменившее окраску (потемневшее и почерневшее). Цельное сырье, измельченное сырье – не более 3 %. Стебли (в том числе отделенные при анализе). Цельное сырье, измельченное сырье – не более 50 %.

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

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

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

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

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

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

Количественное определение. Цельное сырье, измельченное сырье, порошок: сумма флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 2,5 %, сумма гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту – не менее 4,0 %.

Сумма флавоноидов в пересчете на рутин.

Приготовление растворов.

Раствор СО рутин. Около 0,05 г (точная навеска) СО рутин, предварительно высушенного при температуре 130 – 135 °С в течение 3 ч, растворяют в 85 мл спирта 96 % в мерной колбе вместимостью 100 мл при нагревании на водяной бане, охлаждают, количественно переносят в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят объем раствора тем же спиртом до метки и перемешивают (раствор А СО рутин). Срок годности не более 30 сут при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

1,0 мл раствора А СО рутин, 2 мл алюминия хлорида спиртового раствора 2 %, доведенного спиртом 96 % до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл, перемешивают. (раствор Б СО рутин).

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 200 мл, прибавляют 100 мл спирта этилового 80% и взвешивают с погрешностью $\pm 0,01$ г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 1 часа, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Извлечение охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят до первоначальной массы спиртом концентрации, используемой для экстракции, и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы не попали на фильтр, отбрасывая первые 10 мл извлечения (раствор А испытуемого раствора). 1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 2 мл раствора хлорида алюминия 2%,

0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30%, доводят объем до метки и перемешивают (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 30 мин на спектрофотометре при длине волны 415 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1,0 мл раствора А испытуемого раствора и 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30%, доведенной спиртом 80% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутин с алюминия хлоридом. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 1 мл раствора А СО рутин, 0,1 мл уксусной кислоты разведенной 30% и доведенной спиртом 96% до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X, \% = \frac{A * a_0 * 100 * 1 * 25 * 100 * 100 + P}{A_0 * a * 50 * 25 * 2 * (100 - W)}$$

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
 A_0 – оптическая плотность раствора Б СО рутин;
 a – навеска сырья, г;
 a_0 – навеска СО рутин, г;
 P – содержание основного вещества в СО рутин, %;
 W – влажность сырья, %.

Допускается содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин вычислять с использованием удельного показателя поглощения комплекса рутин с алюминия хлоридом по формуле:

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

где A – оптическая плотность раствора Б испытуемого раствора;
 $A_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения комплекса рутин с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм, равный 248;

a – навеска сырья, г;
 W – влажность сырья, %.

Сумма гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту.

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих через сито с отверстиями 1 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляют 125 мл спирта 70%. Колбу с содержимым присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на водяной бане в течение 15 минут, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. После охлаждения извлечение фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу 250 мл. Экстрагирование повторяют еще раз в описанных выше условиях. Полученное извлечение фильтруют в ту же мерную колбу. Объединенные извлечения в мерной колбе доводят спиртом 70% до метки и перемешивают (раствор А).

1,0 мл раствора А переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора спиртом 96% до метки перемешивают (раствор Б). Оптическую плотность раствора Б измеряют на спектрофотометре при длине волны 330 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют спирт 96 %

Содержание суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту в абсолютно сухом сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

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

где A – оптическая плотность раствора Б;

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

a – навеска сырья, г;

W – влажность сырья, %.

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

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

Зав. кафедры химии
Института фармации
ФГАОУ ВО
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова

докт. фарм. наук, профессор,
О.В. Нестерова

«__» _____ 201__ г.

Аспирант
кафедры химии
Института фармации
ФГАОУ ВО
Первый МГМУ им. И.М. Сеченова

Ф.Ш. Сулейманова

«__» _____ 201__ г.