

На правах рукописи



Ильина Маргарита Борисовна

Фармакогностическое изучение и стандартизация сырья ежевики сизой

(*Rubus caesius L.*)

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, доцент

Сергунова Екатерина Вячеславовна

Официальные оппоненты:

Гудкова Алевтина Алексеевна – доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», фармацевтический факультет, кафедра фармацевтической химии и фармакогнозии, доцент

Жилкина Вера Юрьевна – кандидат фармацевтических наук, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Институт фармации и биотехнологии, кафедра фармации и биотехнологии, доцент

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

Защита состоится «19» ноября 2025 г. в 12:00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.02 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2.

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

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ДСУ 208.002.02
доктор фармацевтических наук, профессор

Дёмина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

Актуальность темы исследования

Поиск новых источников биологически активных веществ (далее – БАВ), их всестороннее изучение с целью дальнейшего внедрения в официальную медицину, разработка на их основе новых лекарственных растительных препаратов актуальны в условиях импортозамещения, цель которого – стабилизация экономики страны, поддержка отечественных производителей. Особый акцент делается на виды, давно используемые в народной медицине.

Одним из таких растений является ежевика сизая. Растение известно, как распространенная плодово-ягодная культура, широко культивируется, плоды ежевики нашли свое применение в пищевой промышленности. Помимо прочего, плоды и листья ежевики сизой – средство народной медицины для лечения заболеваний органов пищеварительной и дыхательной систем, в качестве потогонного, жаропонижающего и противовоспалительного средства.

Ежевика сизая (*Rubus caesius* L.) – дикорастущий кустарник семейства розоцветных (*Rosaceae*), повсеместно распространен в Северном полушарии: в Европе (за исключением крайнего Севера), Средней и Малой Азии, Северной Америке. На территории России ежевика сизая произрастает в европейской части страны, в Крыму, на Кавказе. Встречается в зарослях кустарников, по опушкам леса, в оврагах, по берегам рек, вдоль обочин дорог. Несмотря на то, что химический состав всех частей ежевики (листья, плоды, цветки стебли), ее фармакологическая активность и пищевая ценность изучались достаточно хорошо, вся имеющаяся информация не систематизирована и не нашла своего логического завершения. Сведения о растении и его сырье в зарубежных фармакопеех отсутствуют. Только в фармакопее Франции упоминается род *Rubus* без конкретизации отдельных видов.

На российском рынке представлены биологически активные добавки (далее – БАД) фирм “Хорст” (Россия), “Сила природы” (Россия), “Лекрасэт (Россия)”, “Травы Байкала” (Россия), содержащие листья или плоды ежевики сизой.

Широкий ареал произрастания ежевики сизой, ее способность образовывать крупные заросли, обеспеченность дикорастущим сырьем, а также отсутствие систематизированных данных по стандартизации листьев ежевики сизой представляют собой совокупность факторов, позволяющих проводить комплексное фармакогностическое изучение листьев ежевики сизой как перспективного лекарственного средства растительного происхождения.

Степень разработанности темы исследования

В отечественной и зарубежной научной литературе представлены некоторые результаты исследований, направленных, в основном, на изучение состава фенольных соединений (Hering A., Фицева Н.С., Касянчук Е.Ю., Магеррамова С.И и др.), антиоксидантной (Veličković I., Hering A., Grochowski D.M.) и гипогликемической (Schädler V, Дергачева Ж. М.) активности ежевики сизой листьев. Имеются данные по микроскопическому изучению листьев (Мушкина О.В., Шолтанчук О.А.). Научно-исследовательских работ с полным и детальным исследованием листьев ежевики сизой для стандартизации и внедрения в медицинскую практику не было обнаружено.

Цель и задачи исследования

Целью работы явилось фармакогностическое изучение и научное обоснование характеристик подлинности и показателей качества ежевики сизой листьев, как потенциального лекарственного растительного сырья.

Для реализации поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Изучить и проанализировать данные литературных источников по растениям рода *Rubus* и по ежевике сизой (*Rubus caesius* L.), в частности.
2. Провести углубленное морфолого-анатомическое исследование ежевики сизой листьев, выявить основные диагностические признаки и разработать критерии подлинности данного сырья.
3. Используя современные физико-химические методы изучить качественный состав БАВ ежевики сизой листьев (дубильных веществ, флавоноидов, органических кислот, витаминов, аминокислот, свободных сахаров и полисахаридов) и провести их количественную оценку.
4. Определить числовые показатели, характеризующие качество ежевики сизой листьев.
5. Изучить возможность получения из ежевики сизой листьев водного извлечения (настоя) и проанализировать его по показателям качества, регламентируемых Государственной фармакопеей Российской Федерации XV изд. (далее – ГФ РФ XV изд.).
6. Провести экспериментальное изучение фармакологической активности водного извлечения из ежевики сизой листьев.

Научная новизна

Установлены характеристики подлинности ежевики сизой листьев, позволяющие идентифицировать сырье среди листьев близкородственных видов. В ходе работы впервые в ежевике сизой листьях был установлен состав витаминов методом высокоэффективной

хроматографии (далее – ВЭЖХ) и капиллярного электрофореза (далее – КЭ). Получены более полные данные о содержании в изучаемом сырье свободных сахаров и полисахаридов. Проведен анализ содержания органических кислот двумя методами – алкалиметрия и ВЭЖХ. Изучен состав аминокислот в ежевики сизой листьях методом КЭ. Фенольный профиль сырья установлен методами ВЭЖХ, спектрофотометрии (далее – СФМ) (флавоноидный комплекс) и титриметрией (дубильные вещества). Методом атомно-абсорбционной спектрометрии (далее – ААС) установлено содержание макро- и микроэлементов в сырье.

Была разработана и валидирована методика определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин, методика определения водорастворимых витаминов методом капиллярного электрофореза (мицелярная электроосмотическая хроматография).

Для ежевики сизой листьев, как перспективного лекарственного растительного сырья (далее – ЛРС), впервые экспериментально установлены параметры, характеризующие доброкачественность, среди которых процентное содержание влаги, золы общей и нерастворимой в кислоте хлороводородной, измельченности, допустимых примесей. На основании полученных данных впервые разработаны проект фармакопейной статьи «Ежевики сизой листья - *Rubi caesii folia*» и проект Инструкции по сбору и сушке ежевики сизой листьев.

Впервые охарактеризовано в соответствии с требованиями ГФ РФ XV изд. водное извлечение, изготовленное из ежевики сизой листьев. Дана количественная оценка некоторых групп БАВ (дубильные вещества, флавоноиды, органические кислоты, витамины) в извлечении.

В ходе изучения извлечения из ежевики сизой листьев доказана антирадикальная, противовоспалительная и антимикробная активность сырья.

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе проведенной работы получена новая информация о качественном составе и количественном содержании БАВ ежевики сизой листьев. В результате проведенных исследований установлены и обоснованы показатели подлинности и доброкачественности ежевики сизой листьев, доказана противовоспалительная, антирадикальная, антимикробная активности сырья. Предложены методики анализа основных групп БАВ в новом ЛРС – ежевики сизой листья, которые включены в проект фармакопейной статьи «Ежевики сизой листья».

На основании полученных результатов разработан проект Инструкции по заготовке и сушке ежевики сизой листьев, включающий информацию об ареале произрастания и природной среде обитания растения, идентификации производящего растения среди близкородственных видов по внешним признакам, основах заготовительного процесса и сушке листьев; макроскопических и числовых показателях сырья, согласно требованиям ГФ РФ XV изд.

Методология и методы исследования

Методология диссертационного исследования включала поиск, систематизацию и анализ литературных данных, касающихся различных аспектов изученности ежевики сизой листьев. По ходу выполнения работы применялись макро- / микроскопический, химический (титриметрия) и ряд физико-химических методов анализа ЛРС (хроматография, спектрофотометрия). В рамках работы проводились также фармакологические исследования.

Статистическая обработка получаемых результатов проводилась согласно Государственной Фармакопеи Российской Федерации XV издания.

Личный вклад автора

Роль в выборе направления исследования, в определении и постановке цели и задач, а также выборе методов исследования отводится автору работы. Автору принадлежит непосредственное участие в анализе литературных источников по выбранной теме исследования, в реализации экспериментальной части работы по морфолого-анатомическому, фитохимическому изучению, а также по установлению показателей доброкачественности ежевики сизой листьев. Автор принимал участие в получении и анализе полученных хроматограмм (ВЭЖХ) и электрофореграмм (КЭ), в разработке и валидации методик количественного определения флавоноидов и витаминов в сырье, в установлении и анализе фармакологической активности водных извлечений из сырья. Автор лично провел статистическую обработку результатов исследования и подготовил текст научно-исследовательской работы. Диссертант также участвовал в конференциях и подготовке научных публикаций.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты установления основных диагностических признаков ежевики сизой листьев;
2. Результаты качественного анализа и количественной оценки БАВ в ежевики сизой листьях;
3. Результаты валидации разработанных методик определения суммы флавоноидов (метод спектрофотометрии) и водорастворимых витаминов (метод капиллярного электрофореза) в ежевики сизой листьях;
4. Результаты разработки показателей качества сырья и их нормы;
5. Результаты изучения антирадикальной, противовоспалительной, антимикробной активности и оценки безопасности водного извлечения ежевики сизой листьев.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, в частности пунктам 2, 3, 6 паспорта научной специальности.

Степень достоверности и апробация результатов

В ходе работы было применено поверенное и сертифицированное оборудование: хроматограф ВЭЖХ, система капиллярного электрофореза, спектрофотометр и др. Проводилась валидация применяемых методик по параметрам линейность, повторяемость, внутрилабораторная прецизионность, правильность. Вышеуказанное позволило получить воспроизводимые и достоверные результаты.

Основные полученные в ходе диссертационной работы результаты были представлены на: VIII Международной научно-методической конференции «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств» (Воронеж, 2022), IX Международной научная-методической конференция «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств» (Воронеж, 2023), Всероссийской VIII научно-практической конференции «Международная интеграция в сфере химической и фармацевтической промышленности» (Москва, РУДН, 2023), II Научно-практической онлайн-конференции с международным участием «Современные проблемы фармации» (Самара, 2023), X Международной научно-практической конференции молодых ученых «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» (Москва, ВИЛАР, 2022), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Медицина и фармация. Прошлое, настоящее, будущее» (Орехово-Зуево, 2023), II Международной русско-сербской конференции молодых ученых (Москва, Крагуевац, 2024), XXV Международном Съезде ФИТОФАРМ 2024 (Санкт-Петербург, 2024), II Международной научной конференции «Интеграционные связи фармацевтической экологии - 2024» (Москва, 2024), I Международной конференции «Инновационные лекарственные средства: от молекулы до пациента» (Москва, 2024), Всероссийской IX научно-практической конференции «Международная интеграция в сфере химической и фармацевтической промышленности» (Москва, РУДН, 2024).

Апробация научной работы проводилась на межкафедральной конференции Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), протокол № 9 от 11 «апреля» 2025г.

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования по теме диссертации автором опубликовано 10 печатных работ, в том числе 2 научные статьи в журнале, индексируемом в международной базе Scopus, 3 научные статьи в журналах, включенных в Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, 5 публикаций в сборниках материалов Международных и Всероссийских научных и научно-практических конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 150 страницах машинописного текста. Текст состоит из введения, литературного обзора, главы, посвященной описанию материалов и методов исследования, трех глав основных результатов исследовательской работы, а также заключения, практических рекомендаций, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы (146 источников, 60 из которых на иностранном языке) и шести приложений. В работе приведены 38 рисунков и 39 таблиц.

Внедрение результатов исследования

Разработанная методика количественной оценки суммы флавоноидов в ежевики сизой листьях внедрена в деятельность испытательной лаборатории Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Центр лекарственного обеспечения Департамента здравоохранения города Москвы» (Акт от 06.08.2024 г.). Методика качественного и количественного определения водорастворимых витаминов методом капиллярного электрофореза в ежевики сизой листьях используется для оценки качества сырья лекарственных растения в ООО «СайнтификКомплайнс» (Акт от 10.09.2024 г.). Полученные в ходе диссертационной работы результаты углубленного изучения внешнего вида и микроскопических признаков, химического состава, фармакологической активности ежевики сизой листьев внедрены в учебный процесс кафедры фармацевтического естествознания Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (Акт № 531 от 01.11.2024 г.).

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационное исследование было выполнено в рамках плана научно-исследовательской работы кафедры фармацевтического естествознания Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России

(Сеченовский Университет) по теме: «Фармакогностическое изучение лекарственного растительного сырья, лекарственных сборов, лекарственных форм из сырья и разработка методов их стандартизации с учетом влияния антропогенных факторов, оценки качества и сертификации» (гос. регистрация № 01.2.006 06352).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объект и методы исследования

Объектом исследования служили ежевики сизой листья (*Rubus caesius* L.), заготовленные в фазу цветения и плодоношения на территории Московской области и г.Москвы на территории Ботанического сада ФГБНУ ВИЛАР в июле-августе 2022-2023 гг. и высушенные в условиях воздушно-теневого сушки.

Макроскопический анализ проводили визуально, на белом фоне при дневном свете в соответствии с ГФ XV ОФС.1.5.1.0003 «Листья». Исследование микроскопических признаков осуществляли согласно ГФ XV ОФС.1.5.3.0003 «Микроскопический и микрохимический анализ лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения» на микроскопе Leica DM1000 (Германия) с окуляром 10х/20 и объективами 10х/0,25 и 40х/0,65. Вывод изображения на экран - через программу «Leica LAS v4.13 Software».

Определения основных групп БАВ в ежевики сизой листьях проводили согласно фармакопейным методикам и методикам, приведенным в научной литературе. Идентификацию БАВ осуществляли с помощью качественных реакций и ТСХ с использованием пластинок «Sorbfil» ПТСХ-АФ-А (10*15 см), «Merck» (20*20 см). Для количественной оценки содержания отдельных групп БАВ в сырье использовали следующие методы анализа: фенольные соединения - ВЭЖХ (хроматографы Nexera-i LC-2040, Waters 1525), витамины, аминокислоты - капиллярный электрофорез (Капель 105М, Капель 104-Т), сумма флавоноидов, свободных сахара - СФМ (СФ-2000 «Спектр»), элементный состав - ААС (спектрометр «Квант-з»).

Определение экстрактивных веществ в изучаемом сырье проводили согласно ОФС.1.5.3.0006 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод однократной экстракции) ГФ РФ XV изд.

Установление числовых показателей ежевики сизой листьев проводили по следующим ОФС ГФ РФ XV изд.: 1.5.3.0007 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных средств растительного происхождения», 1.2.2.2.0013 «Зола общая», 1.5.3.0005 «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте», 1.5.3.0004 «Определение подлинности,

измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Водное извлечение из ежевики сизой листьев получали и проводили его анализ по общим фармакопейным правилам (ОФС.1.4.1.0018 «Настои и отвары» ГФ РФ XV). Коэффициент водопоглощения для листьев ежевики сизой был рассчитан в соответствии с ОФС.1.5.3.0012 «Определение коэффициента водопоглощения и расходного коэффициента лекарственного растительного сырья» ГФ РФ XV изд.

Для оценки антирадикальной активности водного извлечения из сырья использовали реакцию со свободным радикалом 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ). В качестве препарата сравнения использовали раствор аскорбиновой кислоты фирмы «Мелиген» (Россия), приготовленный в концентрациях от 1 до 100 мкг/мл.

Определение параметров острой токсичности водного извлечения проводили по методу Кербера. Эксперимент по изучению противовоспалительной активности был проведен в опытах *in vivo* с использованием 90 нелинейных мышей-самцов массой 18-22 г. Противовоспалительную активность водного извлечения ежевики сизой листьев изучали на модели формалинового отека лап мышей. (3 группы по 10 животных, препарат сравнения - настой ноготков лекарственных цветков). Формалиновый отёк вызывали однократным введением 0,05 мл 1% формалина.

При определении бактериостатической и фунгистатической активности исследуемых образцов в опытах *in vitro* применяли метод двукратных серийных разведений образцов в жидких питательных средах. В качестве тест-микроорганизмов использовали патогенные грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* 209-P (ATCC 6538), грамотрицательные бактерии *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 6896 и *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, дрожжеподобные грибы *Candida albicans* ATCC 10231 и мицелиальные грибы *Microsporum canis* 352. В качестве питательной среды при определении бактериостатической активности использовали мясо-пептидный бульон (МПБ), при определении фунгистатической активности – жидкую среду Сабуро. Бактериостатический и фунгистатический эффект определяли по минимальному, подавляющему росту бактерий и грибов разведению изучаемого образца, при котором визуально не наблюдали рост микроорганизмов.

Полученные в ходе исследований результаты были подвергнуты статистической обработке согласно ОФС.1.1.0013 ГФ РФ XV изд. «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний» с помощью программы Microsoft Office Excel (США). Валидация методик проводили согласно о ОФС 1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XV изд. При изучении фармакологической активности, достоверность различий между группами оценивали по критерию Манна-Уитни. Различия считались статистически значимыми при уровне $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение морфолого-анатомических признаков

При углубленном изучении морфологических и анатомо-диагностических признаков ежевики сизой листьев были уточнены признаки внешнего вида сырья: листья непарноперистые тройчатосложные, состоящие из 3 листочков яйцевидной или ромбической формы, с короткозаостренной верхушкой, у основания округлые или клиновидные, с двоякозубчатым краем, 2 из которых короткочерешковые, почти сидячие, а один (конечный) на черешочке, размером до 1,5 см. Имеются ланцетные прилистники до 0,5 см в ширину (рис.1).



Рисунок 1 – Ежевики сизой листья, внешний вид

Листья опушены, особенно с нижней стороны, черешки ребристые в сечении, покрыты многочисленными шипами и мелкими щитинками. Длина листьев 15 см, ширина 12 см, отдельные листочки 7 см в длину и 5 см в ширину. Цвет листьев зеленый, серовато-зеленый; с нижней стороны светло-зеленый; черешки и рахис светло-зеленые, иногда с сизоватым налетом. Запах слабый, специфический. Вкус горьковатый, вяжущий.

В результате микроскопического исследования были определены анатомо-диагностические признаки сырья (рис.2) и даны их биометрические характеристики. Клетки эпидермиса извилистые, как с нижней, так и с верхней стороны листа, размером 30 мкм в длину и 10 мкм в ширину. Устьица овальной, почти округлой формы, длиной, в среднем, 20 мкм и шириной 15 мкм окружены 4-6 околоустьичными клетками равного размера (аномоцитный устьичный комплекс). Устьица встречаются на нижней эпидерме листа с частотой от 70 до 140 на 1 мм².

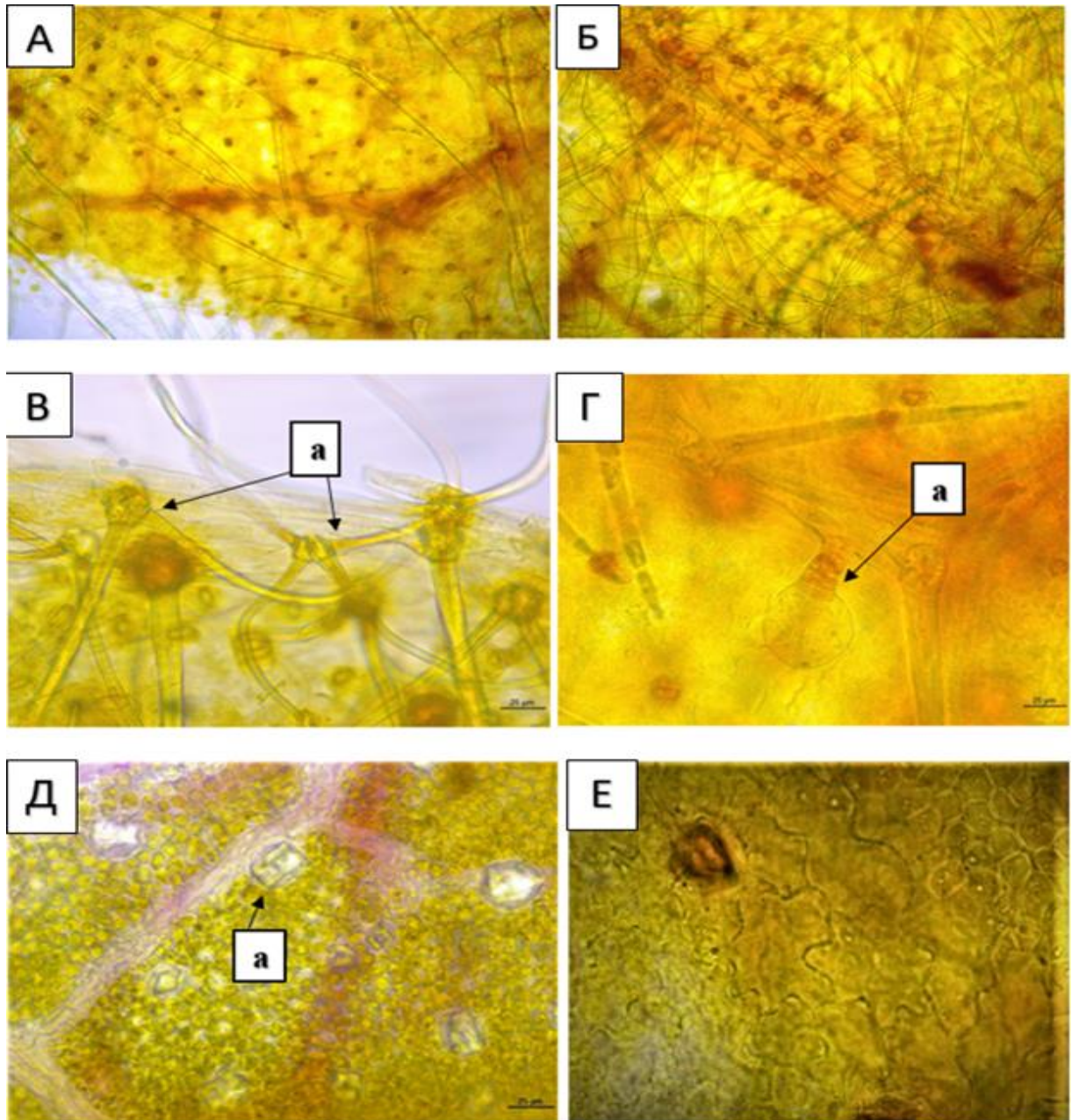


Рисунок 2 – Ежевики сизой листьа

А –Простые волоски верхней ($\times 100$); Б – простые волоски нижней эпидермы ($\times 100$); В – фрагмент края нижней эпидермы с простыми, сросшимися у основания (а) волосками ($\times 100$); Г – фрагмент эпидермы с головчатым (а) волоском с двухрядной ножкой ($\times 400$); Д –включения оксалата кальция в мезофилле: а – кубические кристаллы ($\times 400$); Е – эпидерма с клетками извилистой формы ($\times 400$)

Волоски простые одноклеточные, среди которых встречаются более длинные (до 1 мм) с округлым основанием и более мелкие (100-400 мкм) с расширенным, ближе к треугольной форме основанием; простые одноклеточные, сросшиеся у основания волоски. На верхней эпидерме из простых волосков встречаются, преимущественно, простые одноклеточные с частотой от 22 ± 8 на 1 мм^2 . Нижняя сторона листа более опушена, на эпидерме встречаются как простые одноклеточные (19 ± 5 на 1 мм^2), так и множество перепутанных между собой простых

одноклеточных, сросшихся между собой по 2 или 4 волосков в количестве 10 ± 7 на 1 мм^2 . Железистые волоски листа локализируются по жилке, имеют 1-, чаще 2-рядную ножку и округлую головку. Длина железистых волосков варьирует от 60 до 85 мкм. Диаметр головки – 35-45 мкм. Частота встречаемости на верхней эпидерме - 6 ± 1 , на нижней - 2 ± 1 на 1 мм^2 .

В мезофилле листа встречаются кубические одиночные кристаллы и друзы оксалата кальция в количестве от 3 до 9 на 1 мм^2 размером 11 ± 6 мкм.

При исследовании анатомического строения листа ежевики сизой на поперечном срезе был установлен тип строения листа – дорсовентральный. Под эпидермой расположены два ряда столбчатого мезофилла, ниже располагаются 4-5 рядов губчатого мезофилла (рис.3).

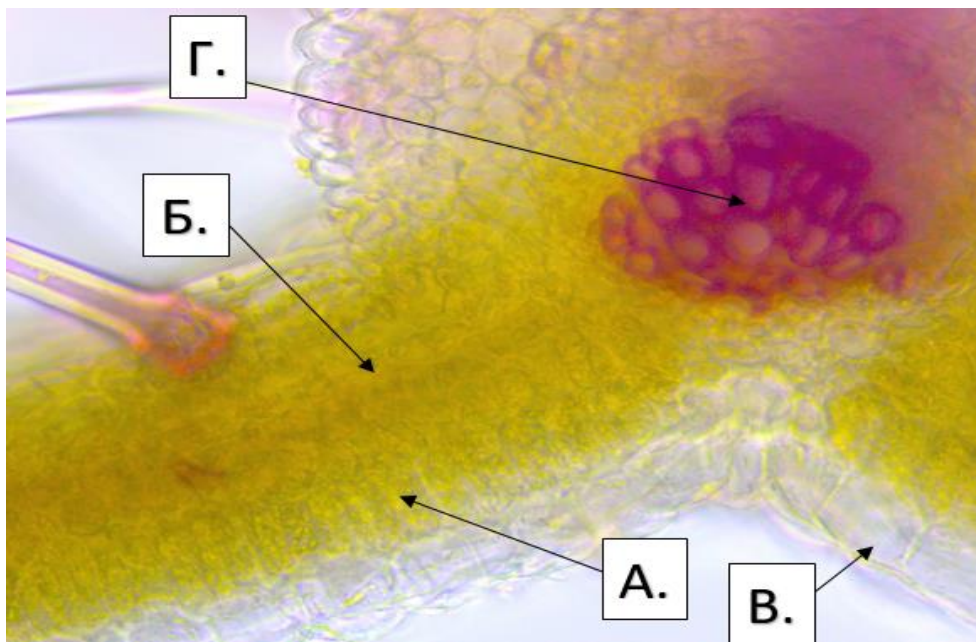


Рисунок 2 – Анатомическое строение ежевики сизой листьев увеличение $\times 400$:
 А – столбчатый мезофилл, Б – губчатый мезофилл, В – клетки эпидермы с кутикулой, Г – проводящий пучок жилки листа

Форма поперечного сечения меняется в зависимости от части черешка: в базальной части более округлая, ближе к медиальной части – подковообразная (округлая с одной стороны, с выемкой, образующей два ребра – с другой). Проводящая система представлена 3-7 сосудисто-волоконистыми пучками (СВП). Ближе к апикальной части СВП, расположенные в ребрах, могут разбиваться на 2-3. СВП - открытые биколатеральные, могут быть окружены друзами оксалата кальция. Флоэмную часть пучка облегает группа склеренхимных клеток с утолщенными стенками (лубяные волокна). Центральную часть черешка занимает основная паренхима с клетками неоднородного размера. Под эпидермой расположены 2 ряда пластинчатой колленхимы. На эпидерме встречается большое количество простых и железистых волосков, а также крупных шипов. Базальная часть черешка почти не опушена.

Результаты макро- и микроскопического анализа позволили выявить и уточнить диагностически-значимые признаки, позволяющие идентифицировать сырье: строение, опушение, цвет и характер края листьев, наличие волосков, простых и железистых, наличие кубических кристаллов и друз оксалата кальция в мезофилле листа.

Определение БАВ ежевики сизой листьев

Для изучения химического состава ежевики сизой листьев готовили водные и водно-спиртовые извлечения. Анализ, проведенный методом ТСХ, позволил идентифицировать аскорбиновую, лимонную, винную, янтарную кислоты; аминокислоты β -аланин, L-глутамин, глицин и L-треонин, а также свободные сахара (глюкозу, фруктозу, рамнозу, галактозу, мальтозу, лактозу, ксилозу, раффинозу) и соединения фенольной природы (танин, галловую кислоту, рутин, цинарозид).

Содержание **суммы флавоноидов** проводили в пересчете на рутин т.к. максимум спектра поглощения спиртового извлечения из ежевики сизой листьев после прибавления раствора алюминия хлорида совпадал с максимумом поглощения комплекса стандартного образца рутина с алюминия хлоридом (рис.4).

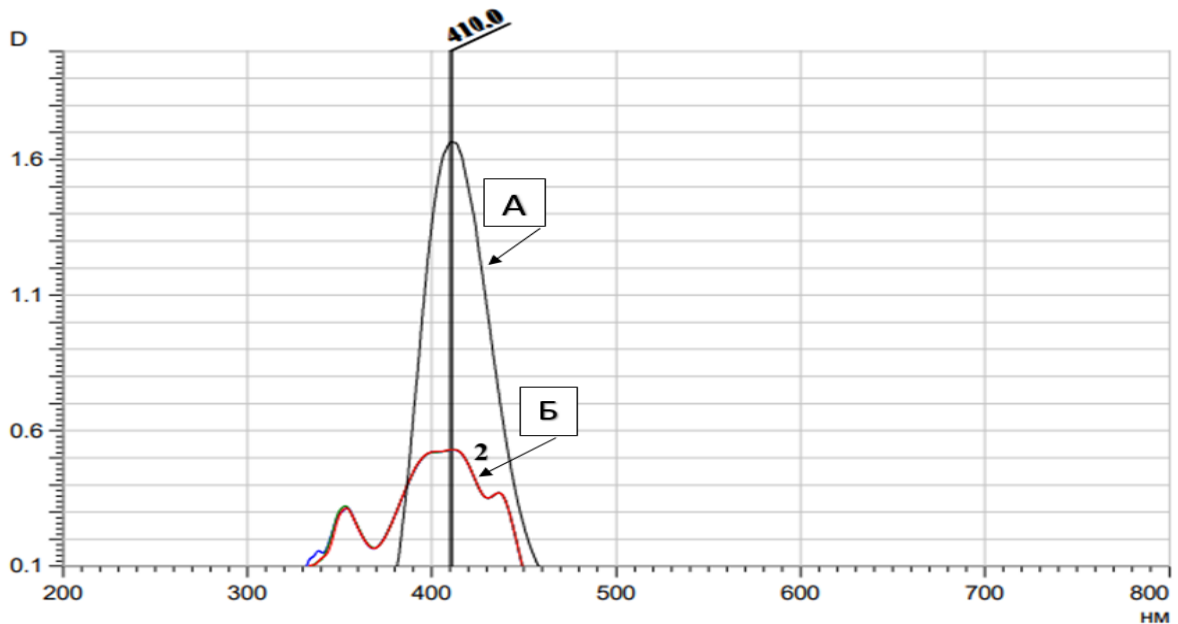


Рисунок 4 – Спектры поглощения спиртового извлечения из ежевики сизой листьев (Б) и раствора СО рутина (А) после комплексообразования с $AlCl_3$

Были подобраны оптимальные условия проведения экстракции суммы флавоноидов: соотношение сырье:спирт этиловый – 1:50, время экстракции – 60 мин, концентрация спирта – 70%, измельчение листьев – до размера частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, объем аликвоты для анализа - 4 мл, объем спиртового раствора алюминия хлорида 2% - 4

мл. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин составило $0,72 \pm 0,02\%$. Установлены метрологические характеристики методики (таблица 1).

Таблица 1 – Метрологические характеристики методики определения суммы флавоноидов в пересчёте на рутин в ежевики сизой листьях

\bar{x} , %	n	s^2	s	Δx	ε , %	P, %	f	T
0,72	3	0,0004	0,0200	0,02	2,78	95	2	4,302

Разработанная спектрофотометрическая методика определения содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин была валидирована по показателям: линейность, правильность, повторяемость, внутрилабораторная прецизионность. Полученные данные показали ее валидность.

Методом ВЭЖХ-УФ анализа спиртовых извлечений (70% спирт этиловый) из ежевики сизой листьев из 31 обнаруженных компонентов было идентифицировано 7 соединений фенольной природы: рутин, изорамнетин, кемпферол, цинарозид, астрагалин, галловая кислота и нарциссин (рис.5). Установлено, что преобладающим компонентом фенольных соединений в ежевики сизой листьях является рутин ($0,114 \pm 0,003\%$).

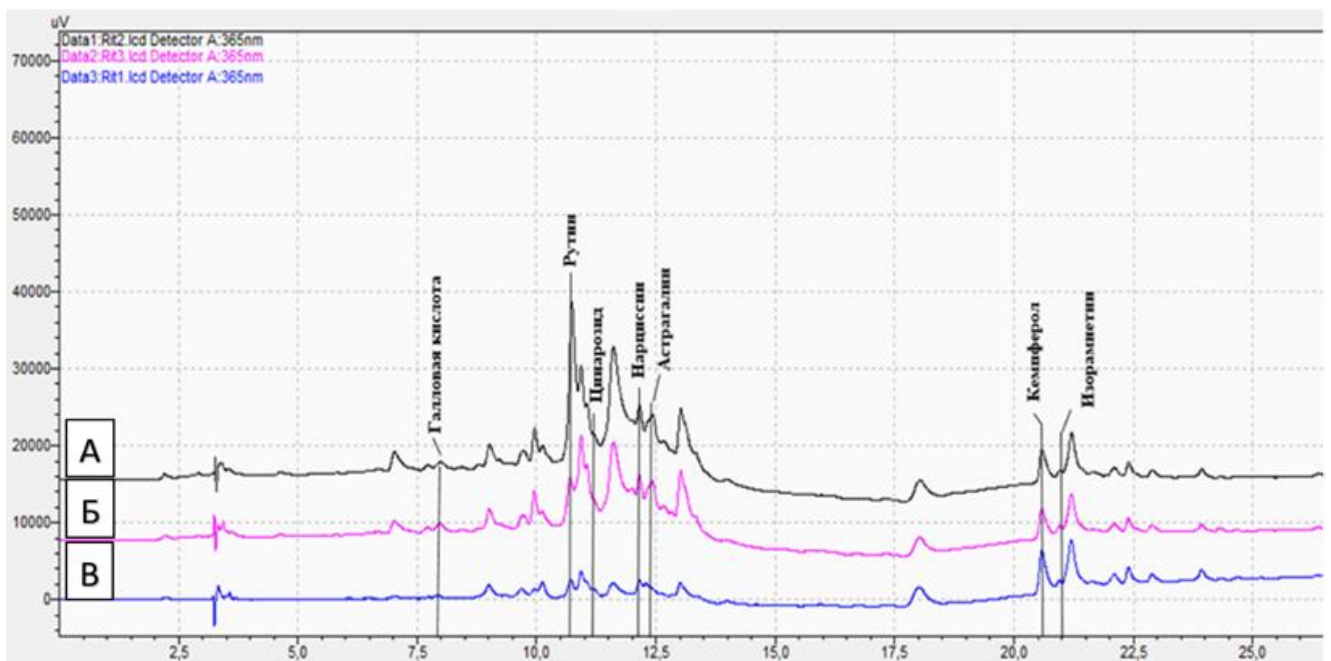


Рисунок 5 – Хроматограмма фенольных соединений в спиртовых извлечениях из ежевики сизой листьев: А– извлечение 50% спиртом, Б – извлечение 96% спиртом, В – извлечение 70% спиртом

Содержание **дубильных веществ** в пересчете на танин, определенное перманганатометрически по методике ОФС. 1.5.3.0008. «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных средствах растительного происхождения» (метод 1) ГФ РФ XV изд. составило $10,01 \pm 0,26\%$.

Количественное определение суммы **органических кислот** в пересчете на яблочную кислоту в листьях ежевики сизой проводили титриметрическим методом (алкаиметрией) по методике, приведенной в ФС.2.5.0093.18. «Рябины обыкновенной плоды» ГФ РФ XIV изд. Содержание составило $1,44 \pm 0,04\%$. Методом ВЭЖХ установлено (рис.6), что в сумме доминируют аскорбиновая ($0,99 \pm 0,03\%$) и яблочная кислоты ($1,99 \pm 0,07\%$).

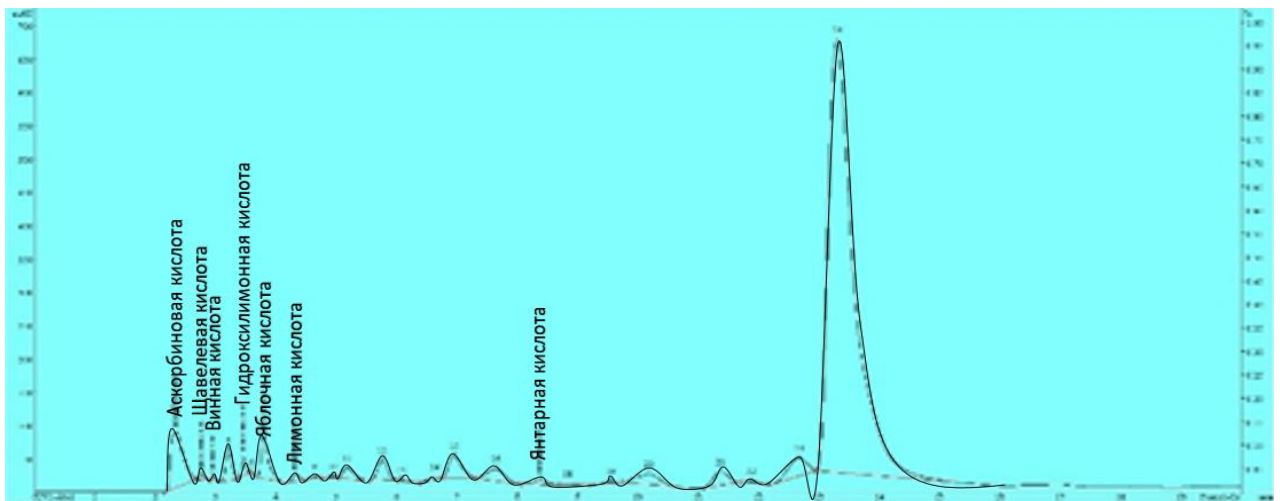


Рисунок 6 – Хроматограмма органических кислот водного извлечения ежевики сизой листьев. Время удерживания аскорбиновой кислоты - 2,02, щавелевой кислоты - 2,33, винной кислоты - 2,73, гидроксимионной кислоты - 3,50, яблочной кислоты - 3,61, лимонной кислоты - 4,26, янтарной кислоты - 8,13 мин.

Количественное определение **аскорбиновой кислоты** проводилось согласно ГФ РФ окислительно-восстановительным титрованием с 2,6-дихлориндофенолятом натрия (полученное содержание – $0,68 \pm 0,3$ мг/г).

Определение компонентного состава водорастворимых витаминов и рутина проводилось методами ВЭЖХ и капиллярного электрофореза. Методом ВЭЖХ в водном извлечении из ежевики сизой листьев из 16 обнаруженных соединений были идентифицированы 5 водорастворимых витаминов группы В, рутин (витамин Р) и аскорбиновая кислота (рис.7).

Преобладающими витаминами в ежевики сизой листьях являются аскорбиновая кислота и рутин, содержание которых составило $0,77\%$ и $0,041\%$ соответственно. Из водорастворимых витаминов группы В наибольшее содержание отмечено у витамина В₃ – $11,89 \pm 0,20$ мг%.

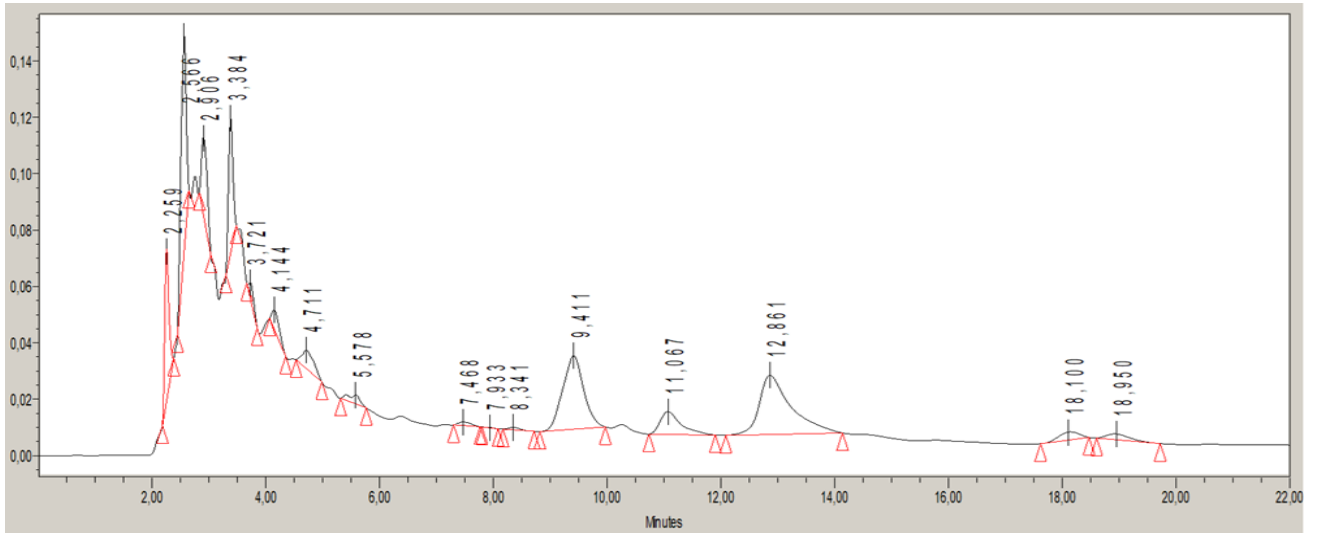


Рисунок 7 – ВЭЖХ-хроматограмма витаминов в ежевики сизой листьях.

Время удерживания аскорбиновой кислоты – 2,906 мин., витамина В₃ – 3,284 мин., витамина В_с – 3,721 мин., витамина В₆ – 4,711 мин., витамина В₂ – 5,578 мин., витамина В₁ – 8,341 мин., рутина – 11,067 мин.

Для разработки методики количественного определения водорастворимых витаминов методом капиллярного электрофореза были подобраны оптимальные параметры для лучшей экстракции: размер частиц сырья (0,4мм), время экстрагирования (30 мин), влияние ультразвука (наличие), экстрагент (вода очищенная). На основании определения линейности, правильности, повторяемости, внутрилабораторной прецизионности методика является валидной.

Разработанную методику использовали для анализа водорастворимых витаминов в ежевики сизой листьях, (рис.8, таблица 2).

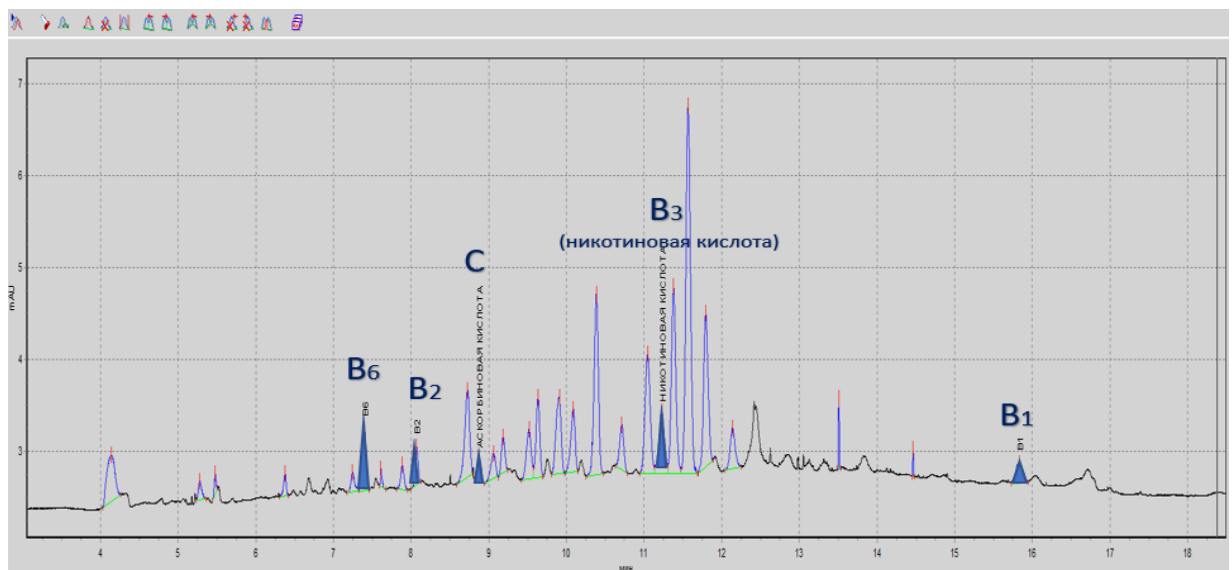


Рисунок 8 – Электрофореграмма водорастворимых витаминов в ежевики сизой листьях

В листьях, собранных в Московской области, обнаружено большое содержание витамина С по сравнению с другими местами сбора сырья. Заготовленное на территории ботанического сада ВИЛАР сырье богато никотиновой кислотой и витамином В1.

Таблица 2 – Содержание водорастворимых витаминов в ежевики сизой листьях (метод капиллярного электрофореза)

Место произрастания	Содержание, мг/г				
	аскорбиновая кислота	никотиновая кислота	витамин В ₆	витамин В ₂	витамин В ₁
Московская обл., Химки	0,89 ± 0,04	0,13 ± 0,01	Не обнаружено	0,036 ± 0,005	0,195 ± 0,01
г.Москва, ФГБНУ ВИЛАР	0,10 ± 0,02	0,57 ± 0,06	0,05 ± 0,02	Не обнаружено	0,35 ± 0,08

Содержание *полисахаридов* в листьях ежевики сизой составило $1,41 \pm 0,03\%$, а суммы полисахаридов и свободных сахаров в пересчете на глюкозу - $3,5 \pm 0,13\%$.

С использованием капиллярного электрофореза установлен состав аминокислот ежевики сизой листьев (рис.9), представленный заменимыми (аланин, глицин, пролин, серин, тирозин) и незаменимыми (аргинин, валин, гистидин, изолейцин, лейцин, лизин, метионин, треонин, фенилаланин) аминокислотами. Суммарное содержание идентифицированных аминокислот составило $6,03\%$. Преобладающими аминокислотами были пролин ($1,31 \pm 0,04\%$), аргинин ($1,05 \pm 0,02\%$) и лейцин ($1,03 \pm 0,04\%$).

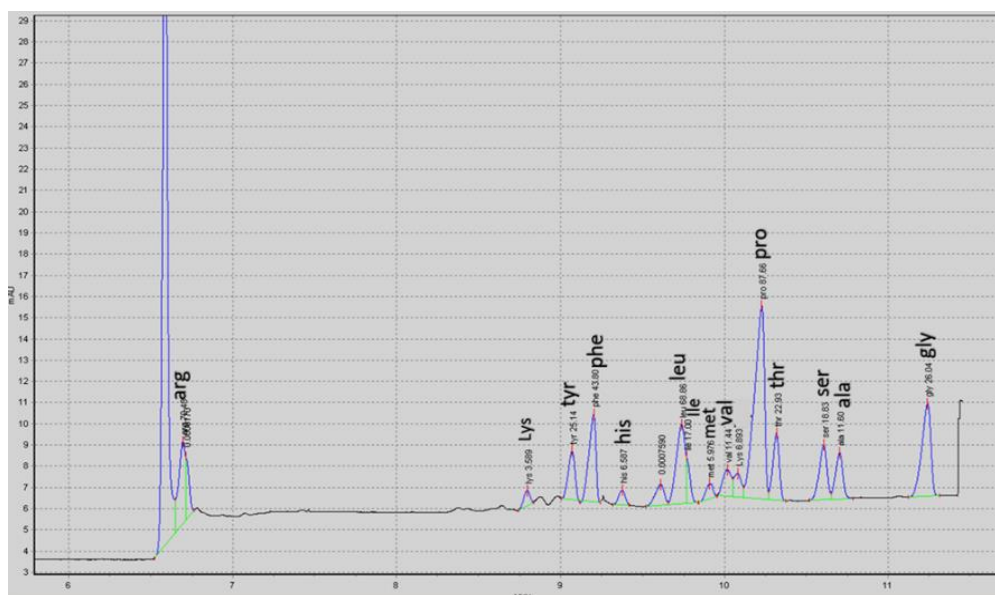


Рисунок 9 – Электрофореграмма аминокислот в ежевики сизой листьях

Для оценки безопасности сырья определяли содержание **тяжелых металлов и мышьяка**. Содержания свинца ($0,081 \pm 0,016$ мг/кг), кадмия ($0,058 \pm 0,012$ мг/кг), ртути ($0,0046 \pm 0,0009$ мг/кг) и мышьяка ($0,265 \pm 0,053$ мг/кг) в листьях ежевики сизой не превышало предельных допустимых значений, согласно ГФ РФ.

Таблица 3 – Содержание минеральных веществ в ежевики сизой листьях ($n = 3$, $f = 2$, $P = 95\%$, $T(f, P) = 4,302$; тип минерализации – сухая)

Элемент	Содержание, мг/г
Кальций (Ca)	$27,96 \pm 2,80$
Магний (Mg)	$19,66 \pm 1,97$
Калий (K)	$2,43 \pm 0,49$
	Содержание, мг/кг
Железо (Fe)	$159,10 \pm 31,82$
Марганец (Mn)	$146,33 \pm 29,27$
Медь (Cu)	$18,58 \pm 3,72$
Цинк (Zn)	$120,85 \pm 24,17$
Хром (Cr)	$5,06 \pm 1,01$

Изучение состава макро- и микроэлементов в ежевики сизой листьях и их количественное содержание проводили методом атомно-абсорбционной спектроскопии, в результате чего установили 8 минеральных элементов. Показано достаточно высокое содержание кальция, магния и железа (табл. 3).

Определение показателей качества ежевики сизой листьев

Для стандартизации и оценки качества ежевики сизой листьев были определены показатели качества (таблица 4).

Таблица 4 – Числовые показатели ежевики сизой листьев

Показатель качества	Содержание
Влажность	Не более 13%
Зола общая	Не более 9%
Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте разведенной 10%	Не более 1%

Продолжение Таблицы 4

Измельчённость	Цельное сырьё: частиц, прошедших сито с размером отверстий 0,18 мм – не более 1%; Измельченное сырьё: частиц, не прошедших сито с размером отверстий 5 мм – не более 7%, частиц, прошедших сито с размером отверстий 0,18 мм – не более 1%
Другие части растения (стебли, цветки и плоды)	Не более 13%
Побуревшие, почерневшие листья	Не более 3%
Органическая примесь	Не более 1%
Минеральная примесь	Не более 0,5%

Полученные результаты были использованы при разработке проекта нормативного документа на «Ежевики сизой листья».

Получение и анализ водного извлечения из листьев ежевики сизой

Водные извлечения из сырья представлены в виде настоев и отваров, изготовление которых регламентируется ОФС.1.4.1.0018 «Настои и отвары» ГФ XV изд. При отсутствии специальных указаний соотношение ЛРС и воды водных извлечений должно составлять 1:10. Для изготовления водного извлечения ежевики сизой листьев был определен коэффициент водопоглощения – $4,4 \pm 0,1$. Водные извлечения были проанализированы по основным показателям качества и по содержанию групп БАВ, которые оценивались при изучении листьев ежевики (таблица 5).

Проведенные исследования показали, что ежевики сизой листья могут быть использованы для изготовления водного извлечения, отвечающего требованиям ГФ РФ.

Таблица 5 - Результаты анализа водного извлечения из ежевики сизой листьев

Показатель	Результат
Цвет	Темно-коричневый
Запах	Пряный, специфический
Вкус	Кисло-горький, вяжущий
рН	5,6
Сухой остаток, %	$2,89 \pm 0,2$
Содержание суммы дубильных веществ в пересчёте на танин, %	$0,43 \pm 0,2$

Продолжение Таблицы 5

Содержание суммы органических кислот (пересчёт на яблочную),%	$0,38 \pm 0,03$
Содержание витамина С, мг%	$4,2 \pm 0,2$
Содержание суммы флавоноидов (пересчёт на лютеолин-7-0-гликозид),%	$0,07 \pm 0,005$

Изучение фармакологической активности

Использование ежевики сизой листьев как перспективной фармацевтической субстанции растительного происхождения потребовало определения их токсичности. Изучение параметров острой токсичности водного извлечения ежевики сизой листьев по методу Кербера выявило, что у мышей всех групп в течение всего срока наблюдения (14 дней) не было клинических признаков интоксикации, клинико-функциональный статус у всех животных не имел отклонений от физиологического состояния, присущего мышам данной возрастной группы и в течение опытного периода гибели мышей в опытных группах не было. Установлено, что водное извлечение относится к практически нетоксичным.

Измерение антирадикальной активности проводилось *in vitro* методом ДФПГ, основанном на реакции 2,2 –дифенил-1-пикрилгидразида (ДФПГ) с антиоксидантом, в результате чего идёт восстановление ДФПГ и снижается оптическая плотность раствора. На основании полученных результатов изучения антирадикальной активности водного извлечения из листьев ежевики сизой была построена зависимость процента связывания радикала от концентрации извлечения (сухой остаток, мкг/мл) (рис.10). Препаратом сравнения служил раствор аскорбиновой кислоты.

Значение IC50 водного извлечения ежевики сизой листьев составило $43,6 \pm 0,4$ мкг/мл, что в 1,5 раза ниже антирадикальной активности раствора аскорбиновой кислоты ($IC_{50} = 29,1 \pm 0,64$).

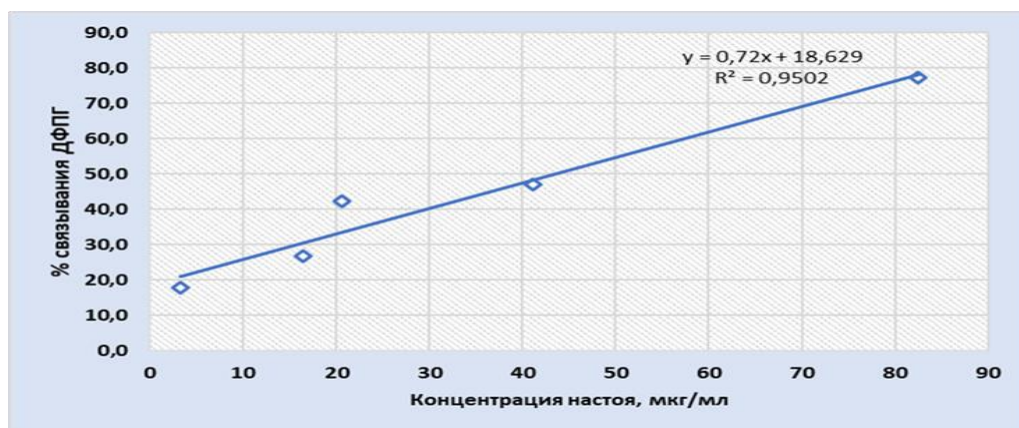


Рисунок 10 – Зависимость процента связывания свободного радикала ДФПГ от концентрации водного извлечения из ежевики сизой листьев

При изучении противовоспалительной активности на модели формалинового отёка лап мышей, было установлено, что водное извлечение ежевики сизой листьев обладало противовоспалительным действием, сопоставимым с действием настоя ноготков лекарственных цветков.

Экспериментально подтверждено, что водное извлечение ежевики сизой листьев обладало умеренным бактериостатическим действием в отношении штаммов грамположительных (*Staphylococcus aureus*) и грамотрицательных бактерий (*Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*). Отмечена также фунгистатическая активность в отношении мицелиального гриба *Microsporium canis* в разведении 1:16 и слабая активность в отношении дрожжеподобного гриба *Candida albicans* в разведении 1:4.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненных комплексных фармакогностических исследований был разработан новый вид лекарственного растительного сырья «Ежевики сизой листья».

Основные результаты экспериментальных исследований ежевики сизой листьев нашли отражение в следующих выводах:

1. Проведенный информационный анализ показал, что степень изученности ежевики сизой листьев в настоящее время недостаточна. На российском рынке ЛРП ежевики сизой отсутствуют; нормативная документация, регламентирующая качество сырья не разработана. В связи с этим, требуется детальное изучение ежевики сизой листьев с последующей стандартизацией сырья.

2. В результате проведенных исследований уточнены и расширены характеристики внешнего вида и анатомо-диагностические признаки ежевики сизой листьев, позволяющие осуществить идентификацию сырья, такие как строение листа (сложный, тройчатый), характер верхушки (коротко-заостренная), наличие широкого прилистника, обильное опушение, цвет (сероватый); наличие простых, сросшихся у основания волосков, железистых волосков, извилистая форма клеток эпидермы, кубические кристаллы оксалата кальция в мезофилле. Дана биометрическая характеристика выявленных признаков и проведена их визуализация.

3. Физико-химическими методами изучен состав БАВ ежевики сизой листьев. Доказано наличие некоторых флавоноидов (рутин, цинарозид), дубильных веществ (галловая кислота и танин), некоторого ряда органических кислот (лимонная, винная и янтарная), полисахаридов и свободных сахаров, незаменимых и заменимых аминокислот и водорастворимых витаминов (аскорбиновая кислота и витамины группы В). Установлено содержание упомянутых групп БАВ различными фармакопейными методами анализа: суммы

флавоноидов – 0,72% (СФМ), суммы дубильных веществ – 10,01% (перманганатометрия), аскорбиновой кислоты (витамина С) – 0,067%, 0,77%, 0,089% (титриметрия, ВЭЖХ, и КЭ соответственно), водорастворимых витаминов группы В – суммарно 0,0175% и 0,117% (ВЭЖХ и КЭ соответственно), органических кислот – 1,44% и 4,1% (титриметрия и ВЭЖХ соответственно), свободных сахаров – 3,5% (СФМ), полисахаридов – 1,41% (гравиметрия), аминокислот – 6,03% (КЭ). Установлен минеральный состав сырья: Са (27,96 мг/г), Mg (19,66мг/г), К (4,36 мг/г), Fe (220,16мг/кг), Mn (146,33мг/кг), Zn (120,85мг/кг), Cu (50,76мг/г), Cr (5,06мг/кг).

4. Определены числовые показатели ежевики сизой листьев: влажность, зола общая и нерастворимая в хлористоводородной кислоте, измельченность, допустимые примеси, содержание суммы дубильных веществ в пересчете на танин, суммы флавоноидов в пересчете на рутин, экстрактивных веществ, извлекаемых водой.

5. Проведен анализ водного извлечения ежевики сизой листьев в соответствии с требованиями ГФ РФ XV изд., дана его характеристика, определены числовые показатели (рН=5,6, сухой остаток=2,89%, содержание дубильных веществ – 0,43%, органических кислот – 0,38%, витамина С (аскорбиновой кислоты) – 4,2мг%, флавоноидов – 0,07%).

6. Установлено, что водное извлечение ежевики сизой листьев относится к практически нетоксичным. Экспериментально доказана противовоспалительная, антимикробная и антирадикальная активность водного извлечения ежевики сизой листьев. Установлено, что водное извлечение ежевики сизой листьев обладало противовоспалительным действием (снижение формалинового отёка на 21%); проявляло умеренное бактериостатическое действие в отношении грам(+) бактерий *Staphylococcus aureus* и грам(-) бактерий *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* и *Pseudomonas aeruginosa*, а также фунгистатическую активность в отношении *Microsporum canis* и слабую активность в отношении *Candida albicans*.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные в ходе настоящей диссертационной работы результаты качественного и количественного анализа БАВ, установления характеристик подлинности и доброкачественности ежевики сизой листьев могут быть использованы для научно-исследовательской деятельности в испытательных лабораториях. Данные фармакологических исследований и оценки безопасности служат основой для создания новых ЛРП. Результаты исследования расширяют представление о растениях рода *Rubus* и новом ЛРС – ежевики сизой листьях. На основе полученных результатов исследования был разработан проект ФС «Ежевика сизой листья – *Rubi caesii folia*», а также инструкция по заготовке и сушке сырья.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Полученные результаты диссертационной работы могут являться основой для исследований по разработке оптимальной лекарственной формы из ежевики сизой листьев, по выявлению не изученных в рамках данной работы фармакологических свойств сырья и по модификации аналитических методик количественного определения БАВ.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность сотрудникам Центра доклинических исследований ФГБНУ ВИЛАР за содействие в проведении исследований по изучению фармакологической и антимикробной активности водных извлечений из ежевики сизой листьев.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Ильина, М. Б.** Микроскопический анализ сырья ежевики сизой (*Rubus caesius* L.) / **М.Б. Ильина, Е.В. Сергунова** – Текст: непосредственный // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств: материалы 8-й Международной научно-методической конференции / ВГУ – Воронеж, 2022. – С. 252-257.
2. **Ильина, М. Б.** Определение содержания суммы флавоноидов в листьях ежевики сизой и аллеганской (*Rubus caesius* L. и *Rubus allegheniensis* Porter) разных форм произрастания / **М.Б. Ильина, Е.В. Сергунова** – Текст: непосредственный // Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения: материалы X Международной научно-практической конференции молодых ученых / ФГБНУ ВИЛАР – Москва, 2022. – С. 231–235.
3. **Ильина, М. Б.** Применение тонкослойной хроматографии в анализе биологически активных веществ листьев ежевики сизой (*Rubus caesius* L.) / **М.Б. Ильина, Е.В. Сергунова** – Текст: непосредственный // Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств: материалы 9-ой Международной научно-методической конференции. Посвящается 25-летию создания фармацевтического факультета в Воронежском государственном университете / ВГУ – Воронеж, 2023. – С. 263–270.
4. **Ильина, М. Б.** Сравнительное изучение анатомо-диагностических признаков листьев ежевики сизой (*Rubus caesius* L.), ежевики аллеганской (*R. allegheniensis* Porter) и ежевики несской (*R. nessesensis* Hall) / **М.Б. Ильина, Е.В. Сергунова, Н.В. Бобкова** // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2023. – Т. 12. – № 3. – С. 111–117. [Scopus]
5. **Ильина, М. Б.** Анализ аскорбиновой кислоты в листьях ежевики сизой (*Rubus caesius* L.) / **М.Б. Ильина, Е.В. Сергунова** – Текст: непосредственный // Медицина и фармация. Прошлое, настоящее и будущее: материалы IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной году педагога и наставника / Государственный гуманитарно-технологический университет. Орехово-Зуево, 2023. – С. 96–99.

6. **Ильина, М.Б.** Изучение минерального и аминокислотного состава листьев ежевики сизой (*Rubus caesius* L.) / **М.Б. Ильина, Е.В. Сергунова** // **Вестник Смоленской государственной медицинской академии.** – 2024. – № 3. – С. 208–215.
7. **Ильина, М.Б.** Применение метода капиллярного электрофореза в анализе водорастворимых витаминов представителей рода *Rubus* L. / **М.Б. Ильина, Е.В. Сергунова** // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2025. – Т. 14 – № 1. – С. 274 – 283. [Scopus]
8. **Ильина, М.Б.** Состав и содержание некоторых витаминов в листьях ежевики сизой (*Rubus caesius* L.) и водных извлечениях на их основе / **М.Б. Ильина, Е.В. Сергунова** // **Фармация.** - 2024. – Т. 73. – № 3. – С. 33–37.
9. **Ильина, М.Б.** Сравнительный анализ биологически активных веществ в листьях и плодах ежевики сизой (*Rubus caesius* L.) / **М.Б. Ильина, Е.В. Сергунова** // **Фармация.** – 2024. – Т.73. – № 7. – С. 14–19.
10. **Ильина, М. Б.** Изучение соединений фенольной природы и аскорбиновой кислоты в листьях ежевики сизой (*Rubus caesius* L.) / **М.Б. Ильина** – Текст: непосредственный // «Молодая фармация – потенциал будущего»: сборник материалов XIV всероссийской научной конференции с международным участием Молодежного научного общества СПХФУ / Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет. Санкт-Петербург, 2024. – С. 696–698.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ААС – атомно-адсорбционная спектроскопия
 АРА – антирадикальная активность
 БАВ – биологически активные вещества
 БАД – биологически активная добавка
 ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
 ГФ РФ – Государственная Фармакопея Российской Федерации
 ДФПГ – 2,2-дифенил-1-пикрилгидразил
 КЭ – капиллярный электрофорез
 ЛРП – лекарственный растительный препарат
 ЛРС – лекарственное растительное сырье
 ОП – оптическая плотность
 ОФС – общая фармакопейная статья
 ПФ – подвижная фаза
 СВП – сосудисто-волокнистые пучки
 СО – стандартный образец
 СФМ – спектрофотометрия
 ТСХ – тонкослойная хроматография
 УЗ – ультразвук
 УФ – ультрафиолет
 ФС – фармакопейная статья