

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Москва – 2021

Диссертационная 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,
профессор

Нестерова Ольга Владимировна

Официальные оппоненты:

Бубенчикова Валентина Николаевна - доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующая кафедрой фармакогнозии и ботаники

Киселева Татьяна Леонидовна - доктор фармацевтических наук, профессор, Некоммерческая организация «Профессиональная ассоциация натуротерапевтов», директор Научно-исследовательского центра – президент Некоммерческой организации «Профессиональная ассоциация натуротерапевтов»

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»

Защита состоится «19» мая 2021 г. в 13:00 часов на заседании Диссертационного Совета ДСУ 208.002.01 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, г. Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр.2

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, ул. Зубовский бульвар, д. 37/1 и на сайте организации: <https://sechenov.ru>

Автореферат разослан « _____ » _____ 202 г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета ДСУ 208.002.001
доктор фармацевтических наук, профессор



Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Важным направлением научных исследований является поиск лекарственного растительного сырья (ЛРС), сочетающего противовоспалительное, антиоксидантное и антибактериальное свойства 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 водно-спиртовых извлечений, позволяющее оптимизировать нормативную

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

Степень разработанности темы

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 Российской Федерации (ГФ РФ). Содержание суммы групп биологически активных веществ (БАВ) и их компонентный состав в траве золотарника изучены мало.

Цель и задачи исследования

Цель диссертационной работы – разработка и совершенствование методик качественного и количественного анализа ЛРС 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 методику определения суммы флавоноидов в водно-спиртовом извлечении из сырья травы золотарника канадского, валидировать методику количественного определения.

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 цветков (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 (СФМ) и разработана методика количественного определения гидроксикоричных кислот методом СФМ.

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 спирто-водных 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 спирто-водном извлечении.

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.

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.

Достоверность научных положений и выводов

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 провалидированы 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.

Личный вклад автора

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

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.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

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

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

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 Российской Федерации (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).

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 рисунок, 7 приложений. Библиографический список состоит из 133 источников, из которых 81 отечественных и 52 иностранных.

Во введении приводится обоснование актуальности выбранного направления исследования, сформулирована цель работы и предложены задачи для достижения цели исследования, научная и практическая значимость проделанной работы, методология исследования, положения, выносимые на защиту, доклады и публикации по теме диссертационного исследования, отражен личный вклад автора.

В первой главе (обзор литературы) проанализированы и систематизированы данные научной литературы, характеризующие современное состояние изученности химического состава, фармакологического действия ЛРС – травы золотарника канадского. **Во второй главе** приведены данные об объектах исследования, методы и приборы, применяемые в ходе анализа, данные методического характера. **Третья глава** содержит данные морфолого-анатомического изучения листьев, стеблей, цветков травы золотарника канадского, а также цельного, измельченного сырья и порошка, предложены маркеры анатомического строения. **В четвертой главе** приведены результаты исследований по изучению состава и количественной оценки БАВ различных групп в анализируемом сырье и данные по стандартизации сырья. **В пятой** главе приводятся результаты исследований по качественному и количественному анализу БАВ в спирто-водных извлечениях, приготовленные для апробации

полученных методик анализа при разработке технологии настоек травы золотарника канадского. Приводятся результаты исследований по антибактериальной и антирадикальной активности полученных спиртовых извлечений травы золотарника канадского. В *шестой главе* описаны результаты исследований антиоксидантной активности сырья травы золотарника канадского и спирто-водных извлечений на его основе, а также исследование антибактериальной активности спирто-водного извлечения из травы золотарника канадского.

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).

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись образцы свежих и высушенных надземных частей цветущих растений *S. canadensis*, заготовленные в Московской, Тульской, Тверской и Ростовских областях в 2016-2018 гг. в июне-сентябре в период цветения. Спирто-водные извлечения готовили из высушенного измельченного сырья, содержащего надземную часть (верхние 30 см) растений – стебель, листья, соцветия (herba) согласно правилам сбора ЛРС.

Отбор проб и исследования проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV. В ходе экспериментальных исследований были использованы методики, реактивы, растворители, стандарты, соответствующие требованиям ГФ РФ XIV. В качестве стандартных образцов применяли коммерчески доступные индивидуальные вещества стандарты «Sigma-Aldrich». Обнаружение БАВ осуществляли с помощью качественных реакций, методами ТСХ, ВЭЖХ на высокоэффективном жидкостном хроматографе

«GILSON», СФМ на спектрофотометре SPECORD 250 Analytik Jena AG. Анализ минерального состава был осуществлен с помощью энергодисперсионного рентгенофлуоресцентного анализа (РФА-ЭД) на спектрометре Thermo Scientific Niton FXL 950. Количественное определение дубильных веществ проводили методом ГФ РФ XIV ОФС.1.5.3.0008.18 «Определение содержания дубильных веществ в ЛРС и ЛРП» методом 1 и по запатентованной методике (патент-2439568 Самылиной И.А., Абоянц Р.К., Гринько Е.Н.).

Статистическую обработку полученных экспериментальных данных осуществляли в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV с применением программы «StatSuite» на платформе iOS и «Microsoft Excel 2016».

ИЗУЧЕНИЕ МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКИХ ПРИЗНАКОВ ЛРС ТРАВА ЗОЛОТАРНИКА КАНАДСКОГО

Нами проведено изучение морфологических и анатомо-диагностических признаков цельного и измельченного сырья и порошка травы золотарника канадского. В результате проведенных исследований были установлены признаки для листьев, стеблей, соцветий (ложноязычковых и трубчатых цветков, листочков обертки). Проведены гистохимические реакции с суданом III.

Трава золотарника канадского представляет собой многолетнее растение высотой от 50 до 200 см. Стебли прямостоячие, опушенные. Листья по стеблю расположены очередно, ланцетной формы. Край листа пильчатый. Нижняя сторона листа опушенная. Листовая пластинка имеет одну пару хорошо развитых боковых жилок. Соцветие корзинки на ножке, собранные в изогнутые кисти, при этом образуется широкометельчатое соцветие. Цветки желтые (краевые - ложноязычковые и срединные - трубчатые), обоеполые. Венчик трубчатых цветков сростнолепестный. Плод семянка с хохлатками.

Измельченное сырье представляет собой кусочки листьев, стеблей, соцветий, плодов. Цвет от темно-зеленого до серовато-белого с желтыми цветками.

При рассмотрении измельченного сырья травы золотарника канадского под лупой (10х) видны кусочки листьев зеленого цвета, слабоопушенные или голые с нижней стороны пластинки. Запах слабый, сладковатый.

Микроскопия листа представлена на рисунке 1. Клетки верхнего эпидермиса листа представлены полигональными со слабоизвилистыми стенками, с нижней стороны листа клетки эпидермиса извилистые. С обеих сторон клетки эпидермиса со складчатой кутикулой с бурым содержимым в клетках. 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 ($344 \times 1 \text{ мм}^2$). Размер устьиц с нижней стороны $12 \times 14 \text{ мкм}$, с верхней $10 \times 11 \text{ мкм}$, над жилкой $5 \times 6 \text{ мкм}$. 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. 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.

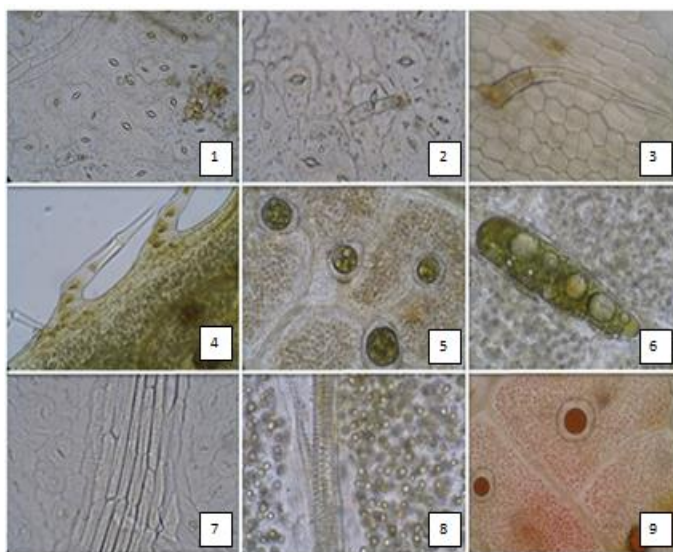


Рисунок 1. Микроскопия листа золотарника канадского

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. $\times 200$)

При рассмотрении препарата стебля с поверхности эпидермис стебля состоит из полигональных неизвилистых клеток, устьичный комплекс аномоцитного типа (длиной 10-12 мкм, шириной 10-14 мкм). 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 (рис.2). Покровная ткань представлена эпидермисом – один ряд клеток прямоугольной формы. Проводящая система представлена крупными открытыми коллатеральными сосудисто-волокнистыми пучками. Над сосудисто-волокнистыми пучками располагается механическая ткань - перециклическая склеренхима, а между пучками – межпучковая склеренхима.

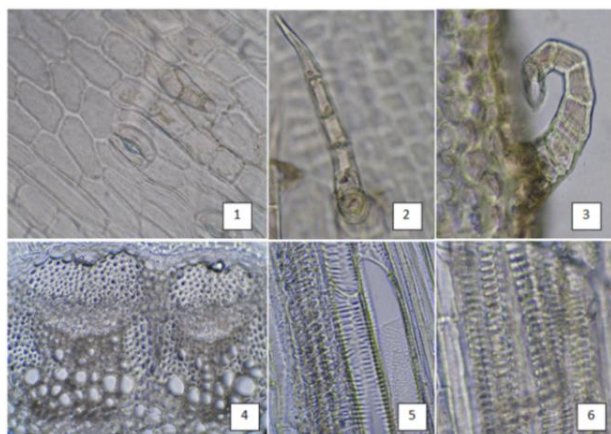


Рисунок 2. Микроскопия стебля золотарника канадского

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, спирального и лестничного типа (ув. x200), 6 – продольный срез стебля, сосуды спирального (ув. x200).

Проведен микроскопический анализ листочка обертки (рис. 3). 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, устья 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.

Эпидермис ложноязычковых цветков состоит из прямоугольных клеток (рис. 4). Устьиц не наблюдалось. Клетки лепестков содержат многочисленные

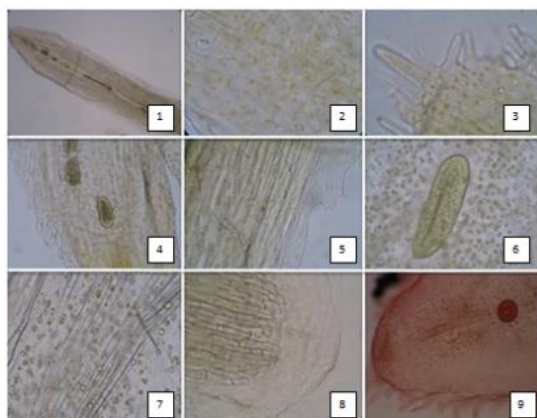


Рисунок 3. Микроскопия обертки соцветия золотарника канадского

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 – вместилища 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. $\times 200$).

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.

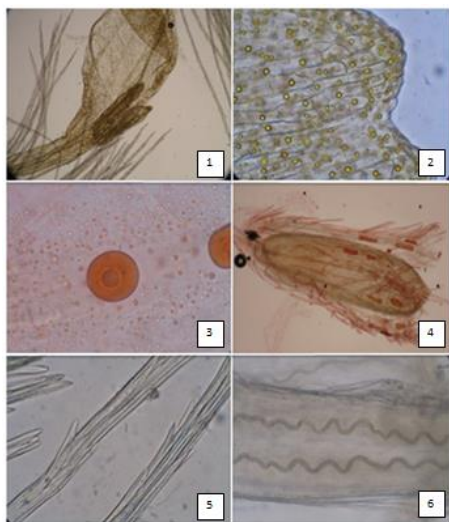


Рисунок 4. Микроскопия ложноязычкового цветка золотарника канадского

1 – ложноязычковый цветок (ув. $\times 40$), 2 – эпидермис лепестка (ув. $\times 400$), 3 – эпидермис обертки после окрашивания суданом III (ув. $\times 200$), 4 – плод – семянка после окрашивания суданом III (ув. $\times 200$), 5 – сросшиеся хохлатки (ув. 400), 6 – спирально закрученные жилки (ув. $\times 200$).

Трубчатые цветки имеют клетки эпидермиса различной формы (от округлых до многоугольных и вытянутых) с равномерным утолщением клеток (рис. 5). 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.

В результате микроскопического исследования травы золотарника канадского были определены характерные особенности анатомического строения листьев, соцветий, стеблей. В качестве идентификационных и диагностических признаков рекомендуется комплекс признаков, присутствующих в листьях, цветках, листочках обертки, стебля, которые вошли в проект ФС.

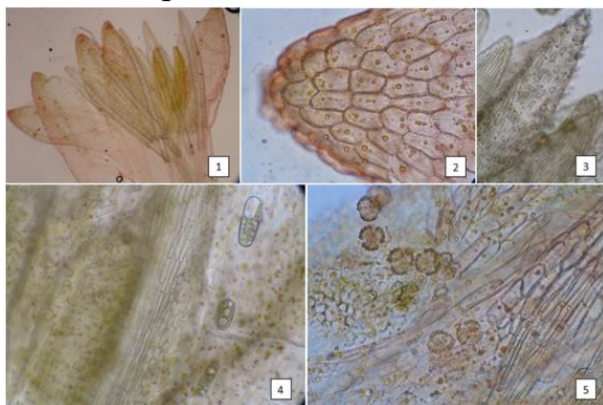


Рисунок 5. Микроскопия трубчатого цветка 1 – микропрепарат трубчатого цветка после окрашивания суданом III (ув. x40), 2 – эпидермис лепестка после окрашивания суданом III (ув. x400), 3 – сосочковидные выросты пестика (ув. x200), 4 – схизогенные вместилища (ув. x200), 5 – пыльца (ув. x200).

ИЗУЧЕНИЕ БАВ ЛРС И ВОДНО-СПИРТОВЫХ ИЗВЛЕЧЕНИЙ

В ходе анализа травы золотарника канадского качественно и количественно определены следующие группы БАВ: дубильные вещества, флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, органические кислоты. Нами экспериментально доказано наличие дубильных веществ методом ТСХ: танин, галловая кислота, пирогаллол. Сумма дубильных веществ методом титрования обнаружена в количестве $2,87 \pm 0,20\%$, методом СФМ, в пересчете на галловую кислоту – $2,46 \pm 0,21\%$ и $0,64 \pm 0,03\%$ (сумма дубильных веществ, осаждаемых раствором коллагена 1%).

Для качественного определения флавоноидов и хлорогеновой кислоты использован метод ТСХ (обнаружены гиперозид, рутин, хлорогеновая кислота, кверцетин). Для количественного определения суммы флавоноидов модифицирована методика, использованная в ФС-42-2777-91: в качестве раствора сравнения используется разбавленный раствор водно-спиртового извлечения; расчет ведется без калибровочного графика с использованием СО

рутина или с использованием удельного показателя поглощения рутина в расчетной формуле; в качестве комплексообразователя используется 2% раствор алюминия хлорида в присутствии уксусной кислоты. Была проведена валидация методики по параметрам: правильность, линейность, прецизионность, сопоставимость. Линейность методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в сырье трава золотарника канадского доказывали в диапазоне аликвотной доли от 0,8 мл до 2,5 мл. Измерения оптической плотности проводились в диапазоне значений от 0,2 до 0,9 при длине волны 410 ± 2 нм. Полученный коэффициент корреляции составил $R^2 = 0,9968$, что отвечает критериям линейности (более 0,99) в анализируемом диапазоне концентраций и поглощения (рис. 6).

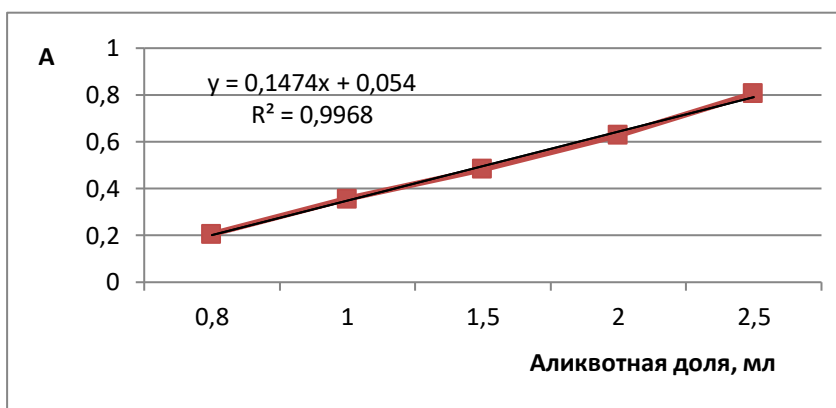


Рисунок 6. Результаты определения линейности методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в траве золотарника канадского

Сопоставимость, прецизионность и правильность методики определяли в диапазоне значений оптической плотности от 0,2 до 0,9. Методика соответствует критериям повторяемости (сходимости), т.к. значение RSD и относительного доверительного интервала меньше 5% (табл. 2, 3), что достоверно при доверительной вероятности 95%.

При сравнении результатов, полученных в разные дни для разных образцов, вычисленное значение критерия Фишера $F_{пр}$ (0,33) не превышало табличного значения (3,44). Следовательно, различие дисперсий статистически незначимо. Величина критерия Стьюдента $t_{пр}$ (0,35) также не превышала табличное значение (2,12). На основании этого можно сделать вывод об отсутствии статистически значимых различий между результатами анализов. Таким образом, при определении прецизионности установлена

сходимость и промежуточная (внутрилабораторная) прецизионность результатов по предложенной методике.

Таблица 1 - Результаты оценки сопоставимости 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	0,10	0,26	0,11	2,57	2,65	2,45

Таблица 2 - Результаты внутрилабораторной прецизионности 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			

Для установления правильности методики изготавливали спиртовые разведения извлечения травы золотарника канадского с добавлением навески рутина 0,010; 0,020; 0,030 г. На каждом уровне проводили 3 измерения. СФМ методика признана правильной, т.к. RSD < 5% (табл. 3).

Таблица 3 - Результаты подтверждения правильности методики методом добавок

№ 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%					

По результатам установления линейности, правильности, сопоставимости и внутрилабораторной прецизионности валидированная методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин методом СФМ при 410 ± 2 нм может применяться в диапазоне оптической плотности 0,2-0,9.

В водных извлечениях травы золотарника канадского методом ВЭЖХ обнаружены щавелевая, винная, яблочная, аскорбиновая, галловая, лимонная, фумаровая и янтарная кислоты (рис. 7). По полученным данным выявлено содержание свободных органических кислот $426,5 \text{ мг} \pm 6,4 \text{ мг}/100 \text{ г}$.

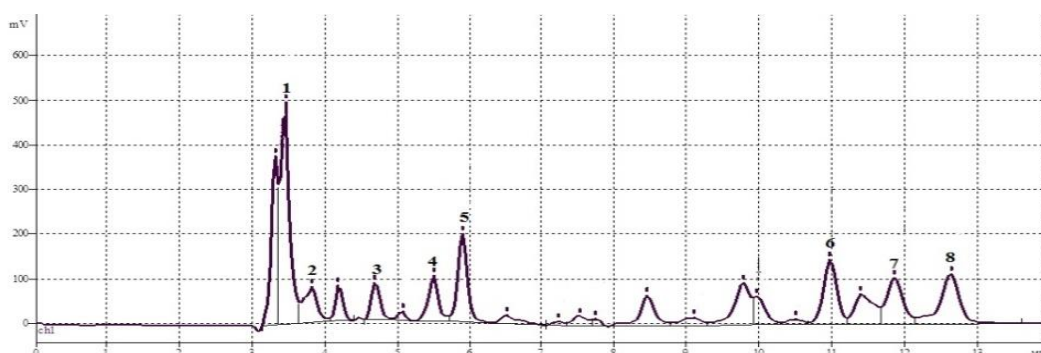


Рисунок 7. Хроматограмма водного извлечения травы *S. canadensis* L. ВЭЖХ – УФ. Времена удерживания органических кислот, мин: 1-щавелевая (3,43); 2-винная (3,81); 3-яблочная (4,68); 4-аскорбиновая (5,49); 5-галловая (5,88); 6-лимонная (10,96); 7-фумаровая(11,85); 8-янтарная (12,63)

Качественный анализ гидроксикоричных кислот (ГКК) проводился методом ВЭЖХ. Были определены следующие ГКК: хлорогеновая, кофейная, цикориевая, хинная, феруловая. Количественный анализ суммы ГКК в пересчете на хлорогеновую кислоту проводился методом СФМ. Данная методика валидирована по параметрам правильность, линейность, прецизионность, сопоставимость в диапазоне значений оптической плотности от 0,2 до 0,9 и при длине волны 330 ± 2 нм. Методом СФМ количественно сумма ГКК в пересчете на хлорогеновую равна $4,37 \pm 0,35\%$.

Результаты количественного определения групп БАВ представлены в таблице 4. В таблице 5 представлены числовые показатели травы золотарника канадского и приведены сравнительные данные показателей качества проекта ФС и ФС 42-2777-91. Измерения проводились для 6 образцов в 3 повторностях. Полученные данные были использованы для нормирования

числовых показателей в разрабатываемой ФС на траву золотарника канадского.

Таблица 4. Количественное содержание групп БАВ в траве золотарника канадского

Группа БАВ	Метод	Содержание
Дубильные вещества	Титрование KMnO_4 (ГФ РФ XIV изд.)	$2,87 \pm 0,20 \%$
	СФМ (в пересчете на галловую кислоту)	$2,46 \pm 0,21\%$
	СФМ (сумма дубильных веществ, осаждаемых раствором коллагена 1%)	$0,64 \pm 0,03\%$
Флавоноиды	СФМ (сумма в пересчете на рутин)	$4,15 \pm 0,41 \%$
Органические кислоты	ВЭЖХ	$426,5 \text{ мг} \pm 6,4 \text{ мг} / 100 \text{ г}$
Гидроксикоричные кислоты	ВЭЖХ	$1016,0 \text{ мг} \pm 10,7 \text{ мг} / 100 \text{ г}$
	СФМ (сумма в пересчете на хлорогеновую кислоту)	$4,24 \pm 0,16 \%$
Полисахариды	Гравиметрия (ГФ РФ XIV изд)	$4,32 \pm 0,21\%$
	СФМ (ГФ РФ XIV изд)	$5,20 \pm 0,27 \%$

Таблица 5. 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
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

Продолжение таблицы 5

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

Также проведено исследование антиоксидантной активности сырья травы золотарника канадского методом СФМ с использованием радикала 1,1 – дифенил – 2 – пикрилгидразила (DPPH). Установлено, что сырье травы золотарника канадского (табл. 6) и спирто-водное извлечение (рис. 8) на его основе обладают антиоксидантной активностью.

Таблица 6 – 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	$37,51 \pm 0,83$
30	$41,37 \pm 1,04$
45	$46,42 \pm 1,35$
60	$47,26 \pm 1,32$

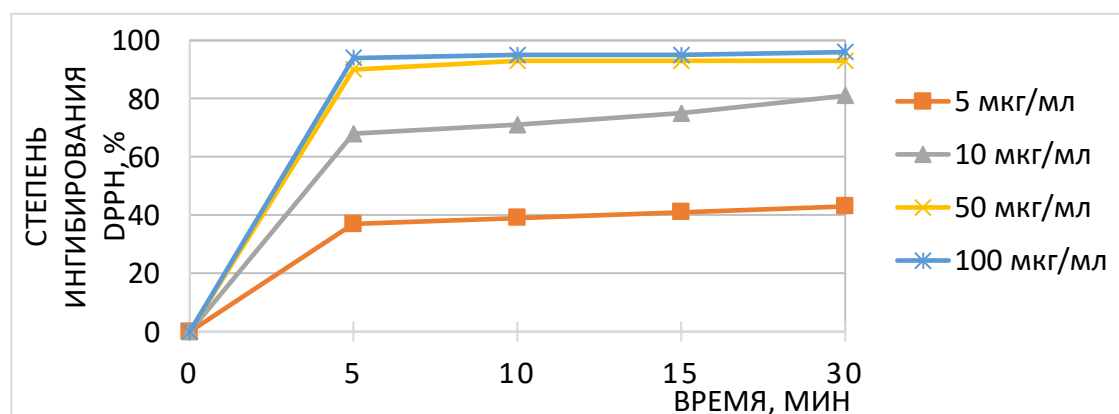


Рисунок 8. Сравнение степени ингибирования DPPH в зависимости от концентрации спирто-водного извлечения травы золотарника канадского и времени реагирования

При исследовании антибактериальной активности спирто-водного извлечения травы золотарника канадского выявлена умеренное антимикробное действие против штамма *Bacillus cereus* ATCC 11778 и

слабого антимикробного действия в отношении тест-штамма *Staphylococcus aureus* ATCC 6538.

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 водно-спиртовом 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.

Практические рекомендации

Проект ФС рекомендуется для рассмотрения и последующего утверждения в установленном порядке. Результаты использования комплекса БАВ травы золотарника канадского целесообразно использовать в научно-практической деятельности организаций, осуществляющих производство и контроль ЛРС и препаратов на его основе.

Перспективы дальнейшей работы

Данные исследования могут служить основой для дальнейшего совершенствования методов оценки качества сырья золотарника канадского и препаратов на его основе. В будущем актуальным будет проведение доклинических и клинических исследований с целью выявления эффективности и безопасности лекарственных форм на основе травы

золотарника в качестве профилактического и лечебного средства при воспалительных заболеваниях полости рта.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Нестерова О.В. Изучение сухого остатка экстрактов травы золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) / Нестерова О.В., Сулейманова Ф.Ш., Матюшин А.А. // Материалы республиканской научно-практической конференции «Фармация: наука, образование, инновации и производство» (с международным участием), Ташкент, 2017, С. 153-154.
2. Нестерова О.В. Количественное определение полисахаридов в траве золотарника канадского спектрофотометрическим и гравиметрическим методами / Нестерова О.В., Сулейманова Ф.Ш. // Достижения вузовской науки 2018: сборник статей IV Международного научно-исследовательского конкурса – Пенза: МЦНС «Наука и Просвещение». 2018, С. 192-194.
3. 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.
4. 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.
5. Сулейманова Ф.Ш. Определение дубильных веществ в траве золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) [Текст] // **Здоровье и образование в XXI веке.** - 2017, Том 19, № 12, С. 302-306. DOI: 10.26787/nydha-2226-7425-2017-19-12-302-306
6. Сулейманова Ф.Ш. Исторический опыт и перспективы использования травы золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) в медицине [Текст] / Сулейманова Ф.Ш., Нестерова О.В., Матюшин А.А. // **Здоровье и образование в XXI веке.** – 2017. - Т. 19, 4: 142-149.
7. Сулейманова Ф.Ш. Анализ фитохимических свойств травы золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) [Текст] / Сулейманова Ф.Ш., Нестерова О.В., Матюшин А.А. // Сборник статей V научно- практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» Издательство Первого МГМУ имени И.М. Сеченова, Москва, 2017, С. 203-205.
8. Сулейманова Ф.Ш. Фитохимические реакции на дубильные вещества травы золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) [Текст] / Сулейманова Ф.Ш., Нестерова О.В., Матюшин А.А. // Сборник материалов XXIV Российского национального конгресса «Человек и лекарство», М.: Видокс, 2017, С. 173.
9. Сулейманова Ф.Ш. Микроскопическое изучение травы золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) [Текст] / Сулейманова Ф.Ш., Нестерова О.В., Матюшин А.А. // **Сеченовский вестник.** - 2017, №3 (29), С. 57-64. DOI: 10.26442/2218-7332_2018.3.64-68
10. Сулейманова Ф.Ш. Сравнительная характеристика фитопрепаратов, используемых для лечения и профилактики заболеваний пародонта, и перспективы использования пленок с экстрактом золотарника [Текст] / Сулейманова Ф.Ш., Нестерова О.В. // Сборник научных трудов «Перспективы лекарственного растениеводства», ВИЛАР, 2018, С. 58-63.

11. Сулейманова Ф.Ш. Изучение технологических параметров и числовых показателей качества сырья травы золотарника канадского (*S. canadensis* L.) [Текст] / Сулейманова Ф.Ш., Нестерова О.В., Матюшин А.А. // **Сеченовский вестник**. - 2018, №3 (33), С. 64-68. DOI: 10.26442/2218-7332_2018.3.64-68
12. Сулейманова Ф.Ш. Определение элементного состава золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) и золотарника карликового (*Solidago nana* Nitt.) с использованием РФА-ЭД [Текст] / Сулейманова Ф.Ш., Нестерова О.В., Аверцева И.Н., Решетняк В.Ю. // **Химическая технология**. – 2019; № 2, С. 82-86.
13. 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
14. 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)
15. 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)
16. Suleymanova F. HPLC Quantification of Hydroxycinnamic and Organic Acids of Canadian Goldenrod (*Solidago canadensis* L.) [Текст] / Suleymanova F., Nesterova O., Matyushin A. // **Pharmacognosy Journal**. – 2019; Vol. 11, No. 2, PP. 400-404. DOI: 10.5530/pj.2019.11.62 (Scopus)
17. 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)

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БАВ – биологически активные вещества
 ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения
 ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
 ГФ РФ – Государственная фармакопея Российской Федерации
 ЛРП – лекарственный растительный препарат
 ЛРС – лекарственное растительное сырье
 РФА –ЭД – энергодисперсионный рентгенофлуоресцентный анализ
 СФМ – спектрофотометрия
 ТСХ – тонкослойная хроматография
 УФ – ультрафиолетовый (спектр, детектор)
 ФС – фармакопейная статья
 ЯМР – ядерно-магнитный резонанс
 RSD – среднее квадратическое отклонение
 Rt (retention time) – время удерживания