

На правах рукописи



Нестеров Георгий Викторович

**Изучение показателей качества листьев ольхи видов *Alnus incana (L.) Moench;*
*Alnus glutinosa (L.) Gaertn***

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:

кандидат фармацевтических наук, доцент

Литвинова Татьяна Михайловна

Официальные оппоненты:

Сливкин Алексей Иванович – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный университет», кафедра фармацевтической технологии, заведующий кафедрой

Успенская Елена Валерьевна – доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», кафедра фармацевтической и токсикологической химии, профессор кафедры

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

Защита состоится «15» октября 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 Министерства здравоохранения Российской Федерации (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 имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, ул. Зубовский бульвар, д. 37/1, и на сайте организации: <http://sechenov.ru/>

Автореферат разослан «___» _____ 2025 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ДСУ 208.002.02

доктор фармацевтических наук, профессор



Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Оценивая программу технологического развития и повышения уровня лекарственного суверенитета «Фарма-2030» по развитию фармацевтической отрасли, В. В. Путин отметил необходимость дальнейшего наращивания инновационных конкурентоспособных лекарственных средств, в том числе на основе лекарственного растительного сырья.

В последние годы ученые стали больше интересоваться возможностью использования частей растений, которые в настоящее время не считаются лекарственным сырьем, но по своим фармакологическим свойствам и содержанию активных веществ могут соперничать с официальными источниками.

К такому растительному сырью можно отнести листья черной и серой ольхи, которые распространены по территории России и долгое время находили применение в народной медицине для лечения различных заболеваний.

В России в качестве лекарственного сырья в основном применяются соплодия ольхи, которые собираются вручную. Растения рода *Alnus* традиционно использовались в медицине различных народов для лечения инфекционных ран и кровотечений. В народной медицине Европы и Канады отвары из листьев ольхи служили в качестве средства против рака.

Информация о применении ольхи для лечения заболеваний желудка и данные о действии эллаготанинов послужили основой для создания нового препарата для терапии язв.

Некоторые виды ольхи зарегистрированы в России как разрешенные для медицинского применения. Листья черной ольхи также внесены в фармакопею Беларуси за их противовоспалительные и антиоксидантные свойства.

Тем не менее, несмотря на широкий спектр фармакологического действия и доступность дикорастущего сырья, листья черной и серой ольхи не признаны официальными и не включены в фармакопею, вероятно, из-за недостатка систематизированных исследований активных компонентов и методов контроля качества. Комплексное изучение листьев ольхи и извлечений из них может подтвердить их потенциал в качестве сырья, что является важной задачей для современной фармации.

Степень разработанности темы исследования

Исследование научной литературы выявило растущий интерес ученых к детальному анализу лекарственного растительного сырья, в частности, листьев ольхи, как источников природных антиоксидантов, способных бороться с оксидативным стрессом, который играет значимую роль в процессе старения.

С помощью хроматографических методов в листьях ольхи разных видов было обнаружено наличие гидроксикоричных кислот, флавонолов (кверцитин, кемпферол, мирицетин) и флаванолов, а также дубильных веществ. В работе Н. В. Шиловой было продемонстрировано, что водные экстракты из листьев ольхи клейкой могут замедлять рост опухолей и повышать эффективность химиотерапии, при этом значительно снижая ее токсичность для клеток крови. Д. В. Моисеев в своем исследовании установил антимикробные свойства экстракта листьев ольхи против *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. Имеются данные о фармакологических испытаниях фитопрепарата альтан, основанного на эллаготанинах из соплодий ольхи клейкой и серой, который показал выраженное противоязвенное действие.

Однако, наибольшее внимание исследователей до сих пор сосредоточено на соплодиях ольхи и продуктах их переработки, в то время как опыт народной и официальной медицины ряда стран показывает, что листья ольхи обладают значительными фармакологическими свойствами.

Цель и задачи исследования

Целью исследования является фармакогностическое изучение и научное обоснование характеристик подлинности и показателей качества нового вида растительного сырья – листья ольхи чёрной (*Alnus incana* (L.) Moench) и серая (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn), а также разработка и стандартизация лекарственных средств на их основе, в том числе антимикробного действия.

Для достижения поставленной нами цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Осуществить анализ отечественной и зарубежной научной литературы, характеризующей современное состояние проблемы исследований состава, фармакологического действия и особенностей стандартизации листьев ольхи видов чёрная и серая и перспектив создания на их основе лекарственных препаратов, а также состояние сегмента рынка антимикробных лекарственных средств растительного происхождения;

2. Провести анализ анатомо-морфологического строения нового растительного сырья - листья ольхи, заготавливаемых от растений ольхи черной (*Alnus incana* (L.) Moench) и серой (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn) (цельного и измельченного), установить основные диагностические признаки, позволяющие осуществить идентификацию и разработать критерии подлинности данного сырья;

3. Изучить качественный состав и количественное содержание биологически-активных веществ (флавоноидов, тритерпеновых сапонинов, органических и фенолкарбоновых кислот, дубильных веществ, полисахаридов) для сырья листья ольхи в свежем, замороженном и высушенном сырье и провести их сравнительную оценку. Разработать показатели качества и нормы, характеризующие содержание БАВ, а также методы их определения;

4. Провести определение товароведческих показателей листьев ольхи черной и серой, а также установить их нормы для включения в разрабатываемую нормативную документацию НД;
5. Изучить влияние способа консервации, измельченности сырья и режимов получения водных и водно-спиртовых извлечений на их качество. Провести определение показателей качества водных и водно-спиртовых извлечений и установить их нормы для включения в разрабатываемую НД; провести изучение антимикробного действия исследуемого сырья и получаемых на его основе водно-спиртовых извлечений листьев ольхи серой и чёрной;
6. Провести оценку адсорбционного действия отходов переработки листьев ольхи и оценить перспективность создания растительного энтеросорбента на их основе.

Научная новизна

Получены новые данные в ходе исследования внешних и микроскопических признаков листьев ольхи видов серая и черная, установлены диагностические значимые признаки, для включения в соответствующие разделы, разрабатываемой НД.

С применением современных инструментальных физико-химических методов (ВЭЖХ-УФ, ГХМС, спектрофотометрия, ТСХ и др.) проведено изучение качественного состава и определено содержание изучаемых БАВ: флавоноидов, органических и гидроксикоричных кислот, аминокислот, полисахаридов, дубильных веществ, сапонинов. Доказана идентичность качественного состава БАВ свежих, замороженных, высушенных, а также подвергшихся ферментации листьев ольхи. Впервые проведена оценка БАВ, извлекаемых из сырья ацетонитрилом, которые могут быть рассмотрены в качестве специфических маркеров экстрактов листьев ольхи черной и серой. По результатам количественного анализа выявлены закономерности изменения содержания БАВ в исследуемом сырье в зависимости от способа консервации, проявляющиеся в существенном снижении БАВ при использовании теплового режима сушки и незначительном – при замораживании. Подтверждена возможность получения экстракционных препаратов из свежего, замороженного и высушенного сырья листьев ольхи двух видов и проведена сравнительная оценка содержания в них сапонинов, органических кислот, флавоноидов, полисахаридов и дубильных веществ. По результатам изучения антимикробной активности выявлено наличие антимикробного действия экстракционных препаратов из сырья на 8 штаммах микроорганизмов.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные результаты проведенных нами экспериментальных исследований позволяют значительно расширить представления о химическом составе БАВ, анатомо-морфологических признаках и биологической активности нового растительного сырья – листья ольхи видов серая

и черная. Научно обоснованы характеристики подлинности и показатели качества фармацевтических субстанций растительного происхождения – настойки и экстракта сухого листьев ольхи. Предложены методики качественного и количественного анализа основных БАВ в новом растительного сырья - листья ольхи, а также в извлечениях из сырья, которые включены в проекты НД.

Положения, выносимые на защиту

- Результаты морфолого-анатомического изучения листьев ольхи черной (*Alnus incana* (L.) Moench) и серой (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn);
- Результаты сравнительного исследования состава БАВ свежих, замороженных, высушенных листьев ольхи;
- Результаты по изучению состава БАВ извлечений из свежих, замороженных и высушенных листьев ольхи;
- Результаты разработки показателей качества листьев ольхи и методов их определения и норм;
- Результаты экспериментальных исследований по определению антимикробной активности исследуемого сырья листьев ольхи и извлечений на их основе.

Методология и методы исследования

Методология работы основана на анализе и обобщении данных информационно-аналитического поиска, охватывающих фитохимическое и фармакологическое изучение листьев ольхи серой и черной, проработку изученности и актуальности темы, совокупность методов фармакогностического анализа, результаты которого могут быть положены в основу разрабатываемой нормативной документации на новые виды сырья - листья (*Folia Alni*).

В работе нами были применены современные физико-химические методы анализа, среди которых хромато-масс спектроскопия, тонкослойная хроматография, ВЭЖХ, спектрофотометрия, гравиметрический и титриметрический анализ, биологические (макро- и микроскопический анализ, оценка антимикробной активности), фармакопейные методики ГФ XV изд. Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с требованиями ГФ XV изд. с применением программного обеспечения «Statistica 8,0»; «Microsoft Excel 2016».

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов исследований листьев ольхи черной и серой и экстракционных препаратов на их основе подтверждена проведением достаточного числа экспериментальных анализов с применением рутинных и современных аналитических методик,

а также статистической обработкой результатов экспериментов и их сопоставлением с имеющимися данными научной литературы. Экспертная оценка подтвердила достоверность предоставленных автором первичных материалов. В работе также исследован максимально доступный объем литературных научных источников, как зарубежных, так и отечественных авторов.

Материалы исследования были доложены автором на V Международной научно-практической конференции, Пенза: «Наука и Просвещение», 2018; XXVII Международной научно-практической конференции «Фундаментальные и прикладные научные исследования: актуальные вопросы, достижения и инновации», Пенза: 2019; Международном научно-исследовательском конкурсе, Пенза: «Наука и Просвещение», 2019; XVI научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием ГОУ «ТГМУ им.Абу али ибн Сино», посвященной 30-летию Государственной независимости Республики Таджикистан и годам развития села, туризма и народных ремесел (2019-2021) Душанбе – 2021; Международной научно-практической конференции «Современное состояние фармацевтической отрасли: проблемы и перспективы» Ташкент – 2021.

Материалы диссертационного исследования доложены и обсуждены на научной межкафедральной конференции кафедр фармации, фармацевтического естествознания, химии и фармацевтической и токсикологической химии им. А. П. Арзамасцева Института фармации им. А. П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М.Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол №10 от 19 мая 2025 г.).

Личный вклад автора

Автору принадлежит основополагающая роль в выборе темы диссертационного исследования, формировании цели и необходимых для ее достижения задач, разработке дизайна исследования, проведении экспериментальных анализов, интерпретации, критическом изучении и обобщении полученных данных. На всех этапах выполнения диссертационной работы, начиная от информационно-аналитического поиска, охватывающего проработку научной литературы, патентной и нормативной документации, постановки задач, заготовки сырья от растений, произрастающих на территории Московской и Тверской области, проведения экспериментальных исследований, статистической обработки, теоретического обобщения и анализа до обсуждения результатов в представленных докладах и научных статьях – вклад автора является основным. Автором лично получены и интерпретированы все экспериментальные данные на используемом измерительном оборудовании, установлены показатели подлинности и доброкачественности листьев ольхи. Результаты проведенных исследований были доложены в

научных публикациях и внедрены в практику научно-практических и образовательных учреждений непосредственно автором.

Внедрение результатов исследования

Результаты проведенного исследования использованы в учебном процессе кафедры фармации Института фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (акт внедрения от 22.03.2022), кафедры фармакогнозии Ташкентского фармацевтического института (акт внедрения от 15.03.2022), подготовлен проект ФС на новый вид сырья листья ольхи. Предложенная автором методика идентификации и количественного определения суммарного содержания тритерпеновых сапонинов в пересчете на олеаноловую кислоту в листьях ольхи внедрена для оценки качества фитопрепаратов ОКК ООО «ФАРМАПАРК» (акт внедрения 17.01.2022), а методика идентификации и количественного определения веществ флавоноидной природы апробирована и внедрена ФГУП НПЦ «Фармзащита» ФМБА России (акт внедрения 17.01.2022).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты выполненного автором исследования полностью соответствуют направлению научных изысканий специальности, в том числе пунктам 2,3 паспорта специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Выполнение диссертационной работы проводили в рамках плана и в соответствии с тематикой научно-исследовательской работы на кафедре фармации ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по теме: «Совершенствование образовательных технологий додипломного и последипломного медицинского и фармацевтического образования» (номер государственной регистрации 01.2.011.68237).

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 13 научных работ, из них 1 статья в журнале, индексируемом в международной базе данных (Scopus), 4 статьи в журналах, включенных в Перечень ВАК при Минобрнауки России, 4 иные публикации, 4 публикации в сборниках материалов всероссийских конференций.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 174 страницах машинописного текста, содержит 42 таблицы и 48 рисунков, состоит из введения, обзора научной литературы, 6 глав собственных исследований, заключения, списка литературы, включающего 182 источника, в том числе 114 иностранных, приложения. Принцип построения диссертационной работы представлен на Рисунке 1.

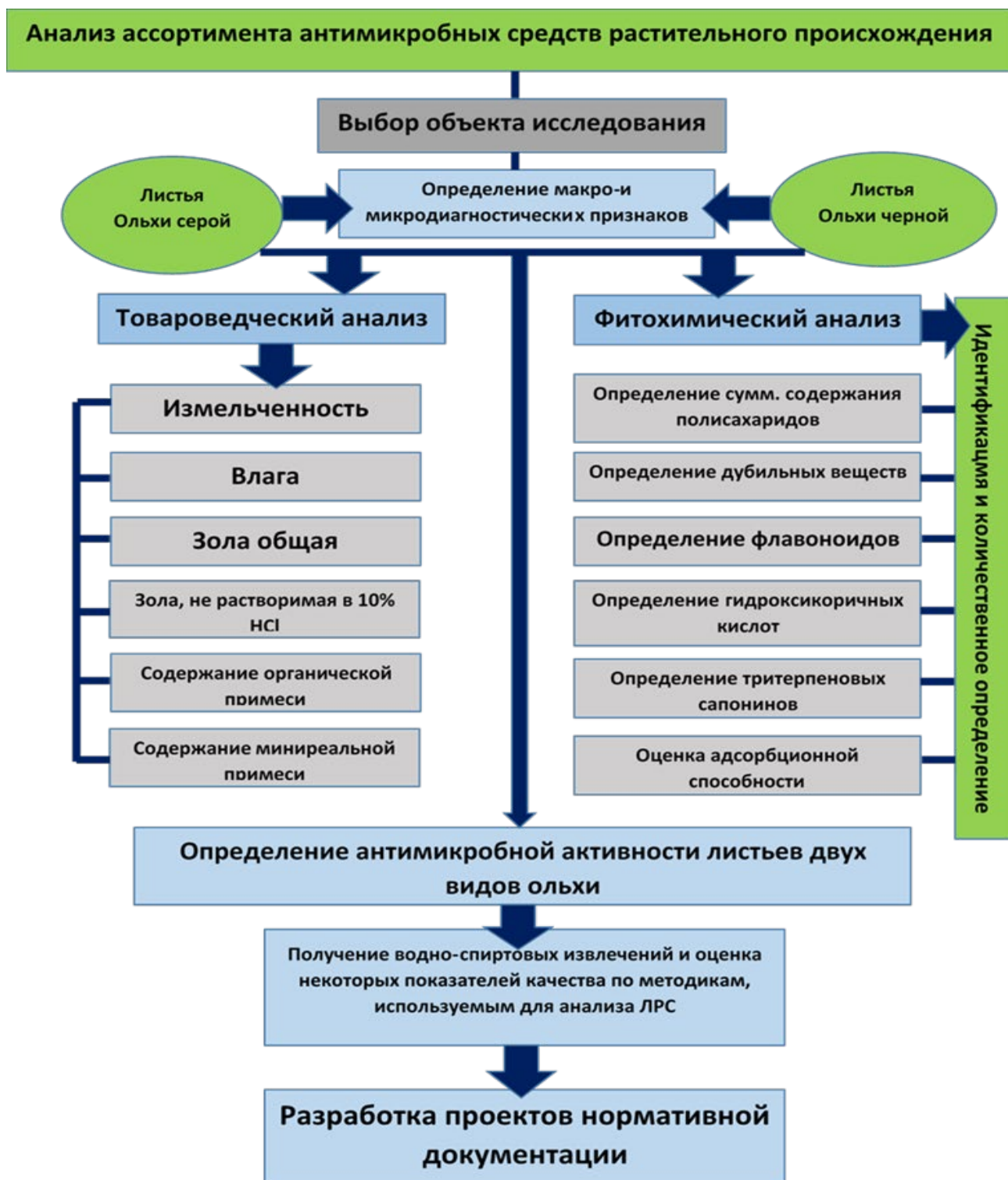


Рисунок 1 – Принцип построения диссертационной работы

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектом исследования служили листья ольхи черной и серой, заготовленные от дикорастущих растений в Московской и Тверской области в летний период 2019-2021 г. Анализ сырья проводили в свежем, замороженном и высушенном виде. Отбор проб для анализа и экспериментальные исследования осуществляли в соответствии с требованиями ГФ XV. Для проведения экспериментальных исследований нами применялись методики, реактивы, растворители, стандарты, соответствующие требованиям ГФ XV. Идентификация и количественный анализ доминирующих групп БАВ проводили с использованием коммерчески доступных индивидуальных веществ-стандартов «Sigma-aldrich» и «Fluka». Для идентификации БАВ в анализируемых образцах листьев ольхи использовались качественные реакции, бумажная и тонкослойная хроматография, ВЭЖХ на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы «GILSON», хромато-масс-спектрометрия. Количественное определение групп БАВ в сырье осуществляли, используя как рутинные (гравиметрия, титриметрический анализ), так и физико-химические методы (спектрофотометрия, ВЭЖХ). Изучение антимикробной активности проводили в отношении штаммов патогенных и условно-патогенных микроорганизмов методом диффузии в агар на плотной питательной среде. Статистическую обработку аналитических данных проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV, ГОСТ Р ИСО 5725-1-02, ГОСТ Р ИСО 5725-3-2002, ОФС 42-01113-09 «Валидация аналитических методик» с применением программного обеспечения «Statistica 8.0» «Microsoft Excel 2016». Результаты считали достоверными при вероятности 95% ($p < 0,05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Макроскопический и микроскопический анализ листьев ольхи видов *Alnus incana* (L.)

Moench и *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn)

Нами было проведено изучение морфологических и анатомо-диагностических признаков цельных и измельченных листьев ольхи, включенных в разрабатываемую нормативную документацию (НД). В результате проведенных исследований для цельных листьев ольхи видов черная и серая были установлены признаки, характеризующие внешний вид сырья – размер и форма листовой пластинки, опушение по жилке, характер края листа и жилкования, цвет, запах, вкус. При смачивании поверхности сырья каплей раствора железоммонийных квасцов развивается черное окрашивание.

При анализе анатомо-диагностических признаков листьев ольхи фармакопейных видов микропрепараты готовили в соответствии с требованиями ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Таблица 1 – Анатомо-диагностические признаки листьев ольхи видов серая (*Alnus incana* (L.) Moench) и черная (*Alnus glutinosa* (L.) Gaertn)

Диагностический признак	Листья ольхи серой (<i>Alnus incana</i> (L.) Moench)	Листья ольхи черной (<i>Alnus glutinosa</i> (L.) Gaertn).
Форма клеток эпидермиса	Клетки эпидермиса верхней стороны листа многоугольные, крупные, с нижней стороны листа-извилистые	Клетки эпидермиса верхней стороны листа многоугольные с утолщением оболочек, с нижней стороны листа- значительно мельче, извилистые
Тип устьичного комплекса	Аномоцитный устьичный комплекс, устьица овальные, окружены 4-9 клетками	Аномоцитный устьичный комплекс, устьица овальные, окружены 4-9 клетками
Наличие и особенности кутикулы	Встречается радиальная складчатость	Без особенностей
Наличие и характер трихом	Присутствуют простые одноклеточные тонко- и толстостенные волоски. Встречаются железки с 5-клеточной головкой, заполненной темно-коричневым содержимым	Присутствуют простые волоски, максимально сосредоточенные по крупным жилкам. Встречаются железки с 5-клеточной головкой с бурым содержимым.
Строение мезофилла	Мезофилл рыхлый	Мезофилл рыхлый
Секреторные структуры	Секреторные включения с бурым содержимым располагаются вдоль жилок листа	Секреторные включения с бурым содержимым располагаются вдоль жилок листа
Кристаллические включения	Друзы оксалата кальция	Множественные друзы оксалата кальция

Анализ данных микроскопического исследования листьев ольхи черной и серой выявил, в основном, идентичность признаков у данных видов, среди которых диагностическое значение имеют: размер и форма клеток эпидермиса (рис.2), тип устьичного комплекса (рис.2), расположение и строение волосков (рис.3), железок с 5-клеточной головкой (рис.4), наличие друз кальция оксалата в мезофилле и секреторные включения (рис.4), расположенные вдоль жилки листа. Межвидовые отличия проявляются в особенностях строения и локализации простых волосков, и количестве друз оксалата кальция.

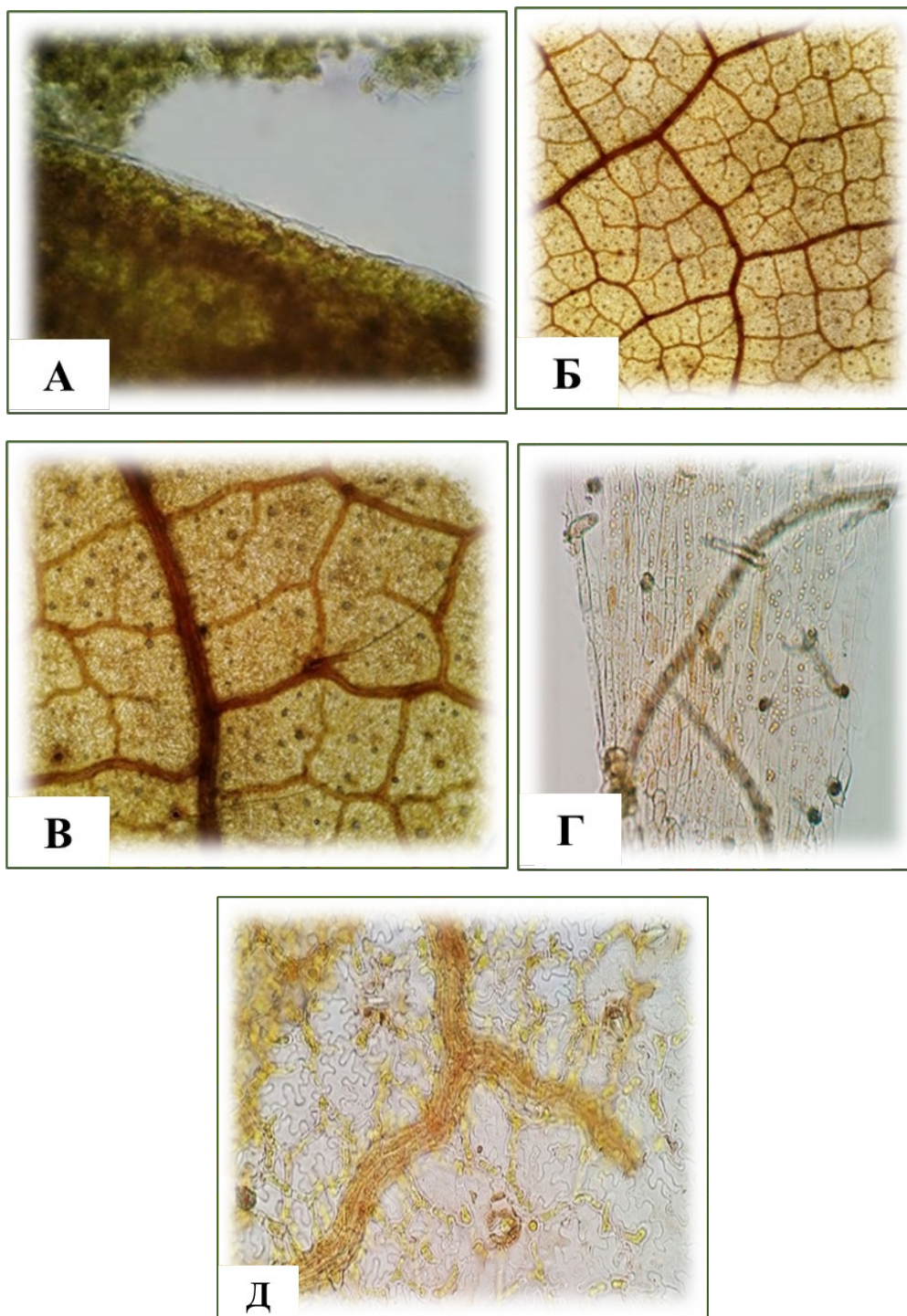


Рисунок 2 – Клетки эпидермиса и устьичный комплекс: А – Верхняя сторона листа с поверхности ольхи черной. ув×10, Б – ольхи серой. ув×10, В – ольхи серой. ув×140, Г – эпидермальные клетки ольхи серой верхней части листовой пластины. ув×40, Д – нижний эпидермис листа с поверхности ольхи серой и устьица аномоцитного типа. ув×100

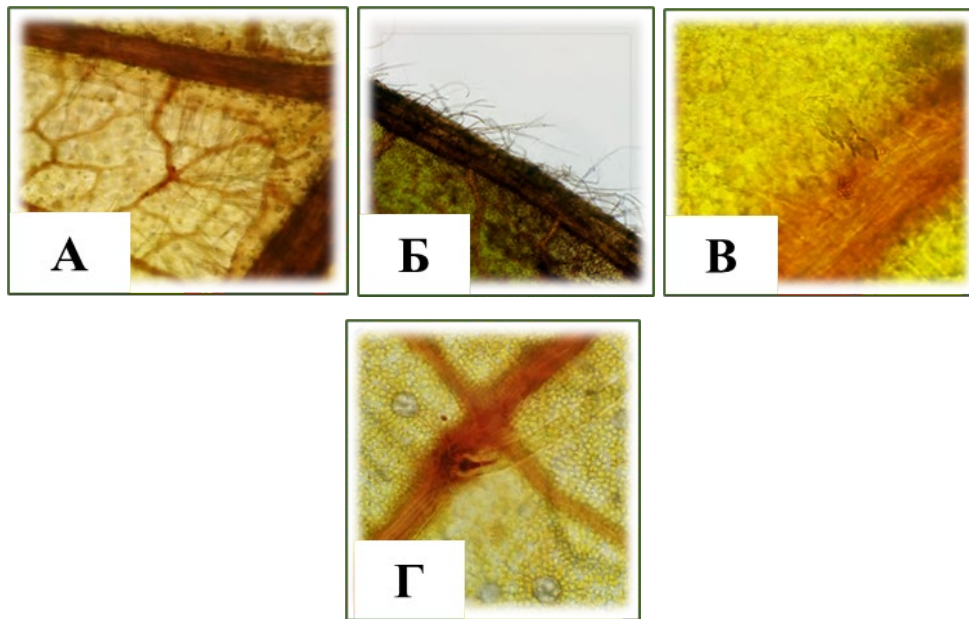


Рисунок 3 – Типы волосков: А – Простые толстостенные волоски, расположенные вдоль жилок, Б – нижняя сторона листа с поверхности ольхи серой. ув×10, обильное опушение края листа простыми волосками у основания листовая пластины. ув×10, В – простой тонкостенный волосок с коричневым содержимым на верхней стороне листа. ув×40, Г – простой толстостенный волосок на нижней стороне листа. ув×40

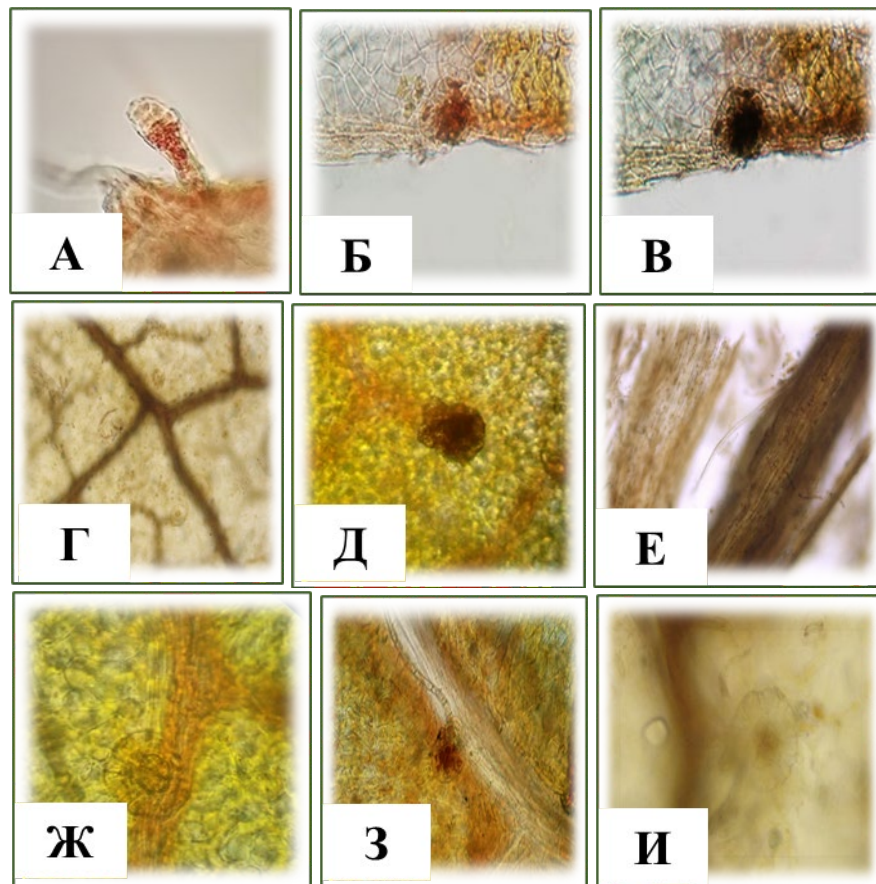


Рисунок 4 – Железки: на короткой ножке с головкой из пяти клеток с коричневым содержимым, вид сбоку. ув×100 (А), с коричневым содержимым до (Б) и после окрашивания ЖАК (В). ув×40, секреторные включения, заполненные коричневым содержимым. ув×10 (Г), ув×40 (Д), бурые секреторные включения вдоль жилки. ув×100 (Е), железки ольхи серой (Ж, З) и черной (И)

В измельченном и порошокванном сырье присутствуют отдельные разрозненные диагностические признаки, в своей совокупности, позволяющие идентифицировать сырье-листья ольхи без видовой принадлежности.

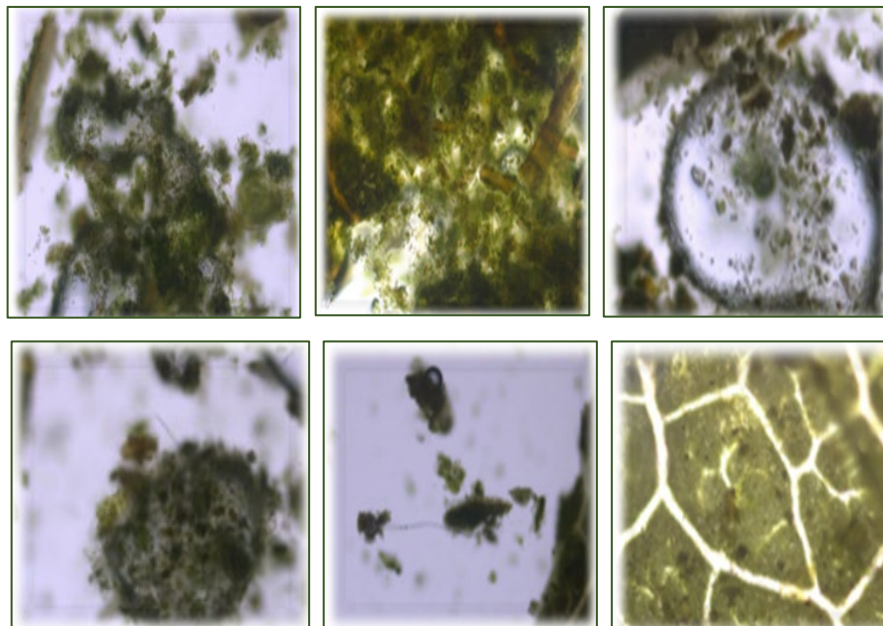


Рисунок 5 – Порошок листьев ольхи черной и серой

Фитохимический анализ листьев ольхи

Для проведения исследований химического состава листьев ольхи серой и черной были получены водные и водно-спиртовые извлечения, которые использовались для проведения качественных реакций с целью идентификации основных групп БАВ (флавоноидов, дубильных веществ, тритерпеновых сапонинов, полисахаридов, фенолкарбоновых кислот и аминокислот).

Качественный анализ извлечений из листьев ольхи серой и черной, проводимый методом бумажной и ТСХ в экспериментально отобранных системах растворителей позволил осуществить идентификацию тритерпеновых сапонинов, флавоноидов, органических кислот, фенолкарбоновых кислот и аскорбиновой кислоты. Отличий в количестве зон адсорбции БАВ на хроматограммах свежих, замороженных и высушенных листьев не наблюдали. Хроматографический анализ этанольного извлечения из листьев ольхи серой и черной, заготовленных в различные фазы вегетации, показал идентичность биологически активных веществ, состав которых представлен в таблице. Таким образом, в составе фенольной фракции листьев ольхи серой и черной из 21 соединения при наличии имеющихся образцов стандартов были идентифицированы 10 - вещества флавоноидной природы (рутин, гиперозид, кверцитин, катехин и лютеолин) и фенолкарбоновые кислоты (галловая, хлорогеновая, неохлорогеновая, кофейная, эллаговая). Общий вид хроматограмм представлен на рисунках. Условия анализа: Колонка Kromasil C18 размером 4,6 x 250 мм, размер частиц 5 мкм, используемая подвижная

фаза метанол-вода-кислота фосфорная концентрированная (400:600:5) в условиях изократического элюирования. Анализ осуществляли при комнатной температуре при скорости подачи элюента 0,8 мл/ мин. Продолжительность анализа 70 мин. Детектирование проводилось с использованием УФ-детектора «GILSTON» UV/VIS МОДЕЛЬ 151.

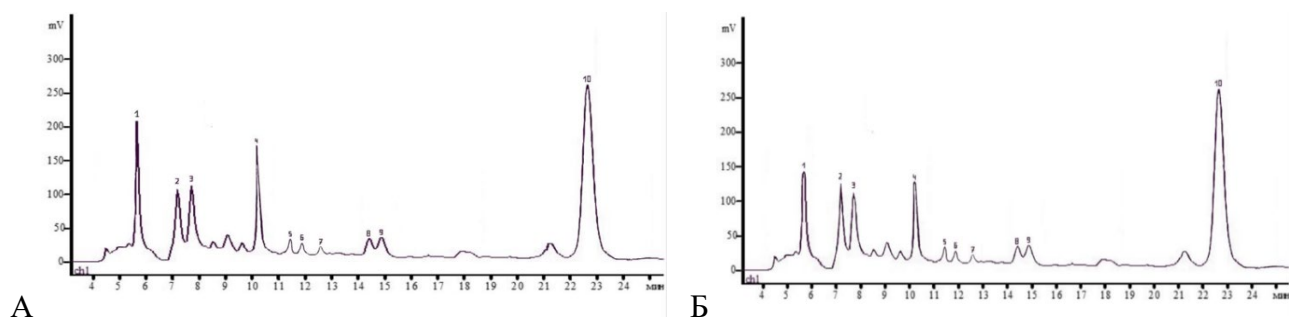


Рисунок 6 – Хроматограмма спиртового извлечения из листьев ольхи черной (А) и серой (Б) методом ВЭЖХ при 280 нм (70% спирт этиловый)

Таблица 2 – Результаты исследования фенольных соединений в сухом и свежем сырье – листья ольхи

№	Время, мин	Площадь	Высота	Название
1	5,900	2286,71	2,92	Галловая кислота
2	7,224	1652,11	1,87	Кофейная кислота
3	7,903	1464,34	1,49	Рутин
4	10,11	2088,28	2,90	Гиперозид
5	11,509	1341,89	1,42	Кверцетин
6	11,850	1093,01	1,13	Лютеолин
7	12,589	531,60	0,96	Катехин
8	14,385	562,90	1,09	Хлорогеновая кислота
9	15,388	588,45	1,21	Неохлорогеновая кислота
10	23,192	7422,06	10,31	Эллаговая кислота

С использованием аминокислотного анализа был установлен состав аминокислот листьев ольхи серой и черной, представленный глутаминовой, аспарагиновой кислотами, глицином, пролином, серином, аланином, лизином, лейцином, валином, треонином, аргинином, изолейцином, гистидином, метионином, тирозином, фенилаланином.

Анализ хлороформного и ацетонитрильного извлечений листьев ольхи проводили на газовом хроматографе AGILENT 7890В с хромато-масс –спектрометром модель 5977 А GC\MSD (Agilent Technologies, США), колонка Agilent HP-5ms (30 м x 0,25 мм x 0.25 мкм), газ-носитель - гелий, с скоростью потока 1.0 мл\мин, объем вводимой пробы -0,2 мкл. . Общий вид хромато-масс-спектра извлечений из листьев ольхи представлен на рисунке. Следует отметить, что состав изучаемых соединений для ольхи двух видов практически совпадает, представлен 28

соединениями, среди которых в качестве веществ- «маркеров» могут рассматриваться хумулан-1,6-диен-3-ол, лупеол (ольха черная), лупеон (ольха серая), в-амирин, гамма-ситостерол, транс-лонгипинокарвеол.

Впервые в извлечении из листьев ольхи серой и черной установлено наличие эвгенола, ранее описанного только для сырья *Alnus pendula*.

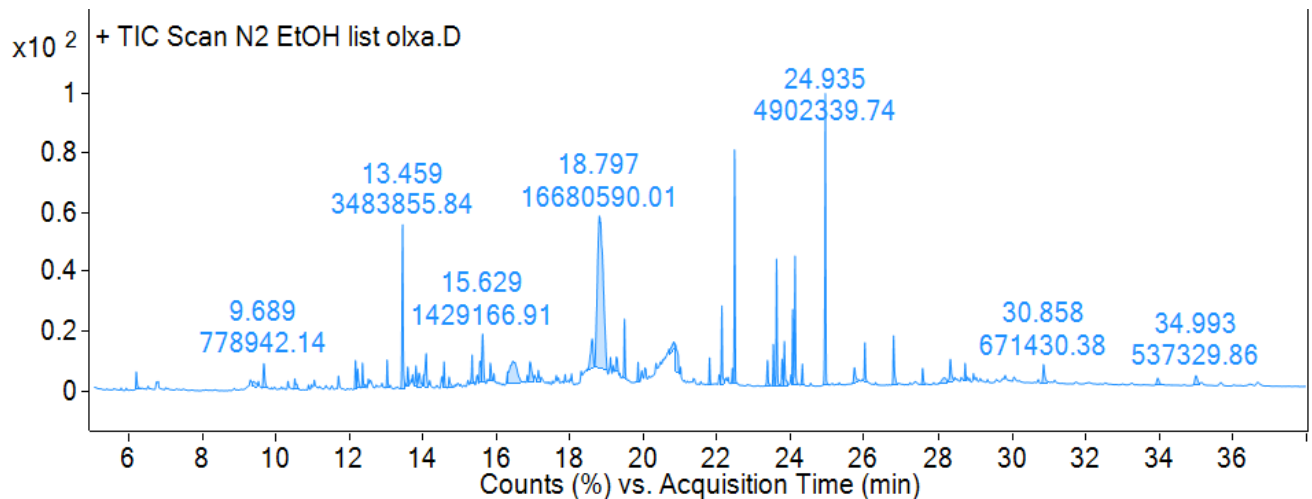


Рисунок 7 – Масс-спектр извлечения из листьев ольхи 95% спиртом этиловым ровняйте все рисунки по бокам как здесь

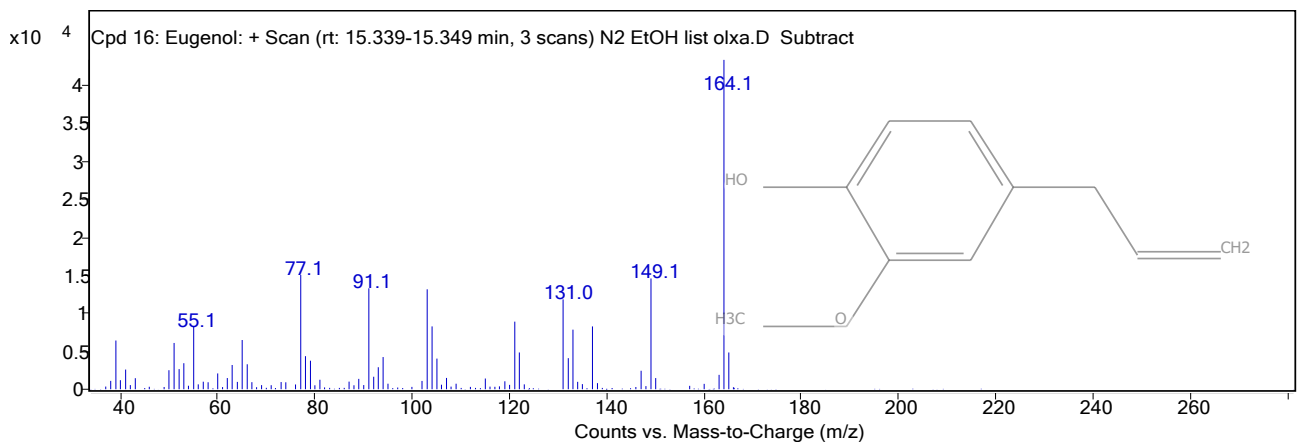


Рисунок 8 – Масс-спектр эвгенола

Анализ основных групп БАВ в сырье проводили по фармакопейным методикам. Определение данных групп БАВ осуществляли для свежих, замороженных и высушенных образцов сырья. Результаты количественного определения представлены в Таблице 3.

Таблица 3 – Содержание БАВ в исследуемых листьях ольхи серой и черной

Объект исследования		Содержание %					
		Полисахариды	Фенолкарбоновые кислоты	Тритерпеновые сапонины	Дубильные вещества	Флавоноиды	Экстрактивные вещества, извлекаемые 70% спиртом этиловым
Листья Ольхи серой Московская область	Свежие	4,34	1,68	1,28	6,24	2,84	25,3
	Замороженные	4,21	1,49	1,26	5,89	2,62	23,4
	Высушенные	4,07	1,27	1,23	5,78	2,38	20,31
Листья Ольхи черной Московская область	Свежие	4,89	1,86	1,39	6,62	2,63	26,4
	Замороженные	4,78	1,69	1,37	6,50	2,45	24,4
	Высушенные	4,53	1,42	1,34	6,31	2,24	21,1

Анализируя экспериментальные данные по содержанию сапонинов, полисахаридов, органических кислот, дубильных веществ, флавоноидов, аскорбиновой кислоты в свежих, высушенных и замороженных листьях ольхи фармакопейных видов, следует отметить, что максимальное содержание изучаемых групп БАВ в свежем сырье. Так, замораживание листьев ольхи привело к снижению суммарного содержания полисахаридов, составившему 2,25% для ольхи черной и 3,00 % для ольхи серой и, снижение содержания фенолкарбоновых кислот составило 9,14 % и 11,3% соответственно, снижение содержания тритерпеновых сапонинов оказалось равным 1,44% и 1,56%, потеря содержания дубильных веществ составила 2,8 - 3,5%, флавоноидов 8,0-13,3%. Анализ высушенных листьев ольхи показал также снижение содержания полисахаридов, составившему 7,4% для листьев ольхи черной и 6,22 % для листьев ольхи серой, снижение содержания фенолкарбоновых кислот составило 23,66 % и 24,40%, снижение содержания тритерпеновых сапонинов составило 3,60% и 3,91%, потеря содержания дубильных веществ составила 6,8-11,4%, флавоноидов 24,4-26,1%.

Определение показателей качества листьев ольхи серой и черной

Для стандартизации и оценки качества листьев ольхи изучаемых видов была проведена оценка таких показателей качества как: содержание листьев, утративших естественную окраску, органическая и минеральная примеси влажность, зола общая, зола, нерастворимая в 10% HCl,

количественное содержание содержания флавоноидов, дубильных веществ и проведена оценка микробиологической чистоты. Учитывая данные качественного анализа, стандартизацию листьев ольхи серой и черной, на наш, взгляд целесообразно проводить по суммарному содержанию флавоноидов в пересчете на рутин спектрофотометрическим методом с применением общеизвестной реакции комплексообразования с алюминия хлоридом. В качестве стандарта применялся ГСО рутин (ФС 42-2508-87), максимум в спектре поглощения которого, совпадал с максимумом в спектре извлечения из сырья. Линейность методики проверяли на пяти отобранных экспериментальных точках (значениях концентрации). Значение коэффициента корреляции, который представляет собой критерий приемлемости линейности, составил 0,9905 (Рисунок 9).

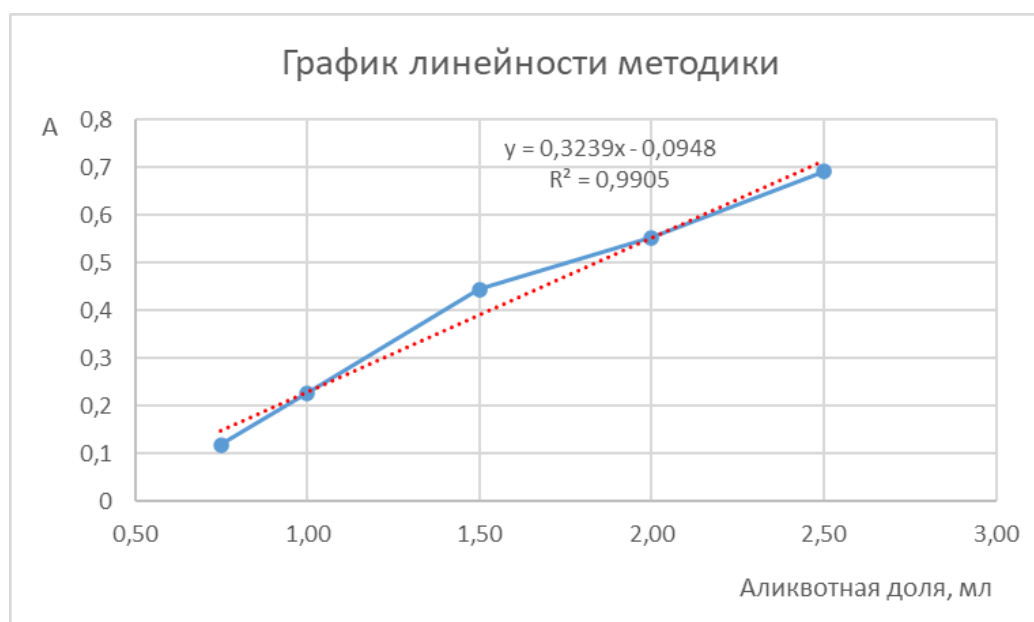


Рисунок 9 – Результат проверки линейности методики спектрофотометрического определения суммарного содержания флавоноидов в пересчете на рутин в листьях ольхи

При выявлении повторяемости нами проводилось шесть параллельных измерений, после чего рассчитывалась величина стандартного отклонения и относительного стандартного отклонения. Относительное стандартное отклонение составило 0,96% (не более 10%), что подтверждает прецизионность предлагаемой методики в условиях повторяемости эксперимента. Воспроизводимость методики проверяли два аналитика на трех исследуемых образцах в трех повторностях.

Правильность методики оценивали методом добавок путем добавления СО рутина, при этом относительное стандартное отклонение не превышает 5%, что подтверждает отсутствие систематической ошибки.

Данные по определению влажности, золы общей, золы, нерастворимой в 10% HCl, содержанию дубильных веществ, проводились по фармакопейным методикам ГФ XV. Результаты представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – Определение числовых показателей и микробиологической частоты в листьях ольхи серой и черной

Анализ	Показатели	Содержание		
		Листья Ольхи черной	Листья Ольхи серой	Смесь листьев
Числовые показатели	Листья, утратившие естественную окраску	2,5 -2,8	1,9-2,6	2,3-2,7
	Частицы, проходящие сквозь сито с диаметром отверстий 3 мм	3,4-3,8	3,0-3,6	3,1-3,7
	Органическая примесь	1,2-1,7	1,6-2,1	1,5-1,7
	Минеральная примесь	0,1-0,4	0-0,3	0,1-0,4
	Влажность	10,8-11,5	12,0-12,8	11,5-12,3
	Зола общая	3,6-4,4	4,2-4,6	3,8-4,3
	Зола нерастворимая в 10% кислоте соляной	0,15-0,28	0,23-0,26	0,19-0,25
	Содержание флавоноидов	2,38	2,24	2.26
	Содержание дубильных веществ	5,78	6,31	5.86
	Экстрактивные вещества, извлекаемые 70% спиртом этиловым	20,31	21,10	20.54
Микробиологическая чистота	Аэробные бактерии	1,1x10 ⁴	1,6	1,5
	Дрожжевые и плесневые грибы	0,7x10 ²	0,9	0,7
	<i>Escherichia coli</i>	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	Семейство <i>Enterobacteriaceae</i>	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
	<i>Salmonella</i>	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Содержание радионуклидов (Sr-90)		Не обнаружено	Не обнаружено	Не обнаружено

Полученные данные были использованы для нормирования числовых показателей в разрабатываемой нормативной документации на листья ольхи.

Изучение состава БАВ экстракционных препаратов на основе листьев ольхи и оценка показателей их качества

Анализ водных и водно-спиртовых извлечений, полученных по фармакопейной методике, осуществляли по содержанию тех же групп БАВ, которые оценивались при изучении листьев ольхи серой и черной. В ходе исследования выявлено, что все отобранные группы веществ переходят в водные и водно-спиртовые извлечения из листьев ольхи. Результаты предварительной оценки качества извлечений из листьев ольхи представлены в Таблице 5.

Таблица 5 – Некоторые показатели качества извлечений из листьев ольхи

Исследуемое извлечение	Внешний вид	pH	Сухой остаток, %	Содержание дубильных веществ, %	Содержание флавоноидов, %
Настой (1:10)	Жидкость желто-коричневого цвета	3,79	2,62	0,653	0,012
Настойка (1:5)	Жидкость зеленовато-коричневого цвета	4,12	4,24	0,876	0,087
Жидкий экстракт (1:1)	Жидкость красно-коричневого цвета	4,48	6,56	1,034	0,159

Учитывая литературные данные, характеризующие антимикробную активность листьев ольхи, нами были проведены исследования антимикробной активности настоя и водно-спиртовых извлечений из исследуемого сырья методом диффузии в агар на плотной питательной среде. Результаты анализа представлены на Рисунке 10.

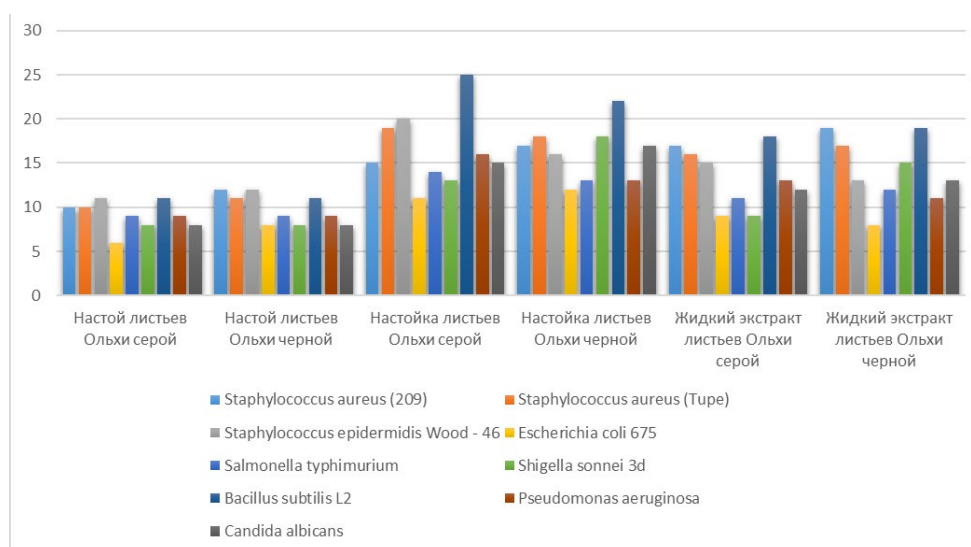


Рисунок 10 – Антимикробная активность извлечений (настой, настойка, жидкий экстракт) из листьев ольхи черной и серой

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результатом данной работы является разработка показателей качества листьев ольхи серой и черной как перспективного растительного сырья, обладающего антимикробным действием. Установлено близкое значение, как содержания биологически активных веществ в листьях ольхи серой и черной, произрастающих в Московской и Тверской областях, так и антимикробного действия в отношении использованных в эксперименте тест-культур микроорганизмов, что позволяет осуществлять стандартизацию данного сырья с использованием единых показателей качества.

ВЫВОДЫ

1. Проведено информационно-аналитическое изучение научной литературы и патентной документации, позволяющее выявить спектр современных требований к качеству листьев ольхи черной и серой, и продемонстрировать востребованность средств антимикробного действия растительного происхождения на фоне тенденции роста резистентных штаммов микроорганизмов.

2. Проведен анализ анатомо-морфологического строения цельного и измельченного растительного сырья - листья ольхи черной и серой свежих, замороженных и высушенных, на основании которого выявлены важнейшие диагностические признаки, позволяющие осуществить идентификацию данного сырья и подготовлены рекомендации для включения в раздел «Определение подлинности», планируемой НД.

3. Определен качественный состав и количественное содержание основных БАВ (тритерпеновых сапонинов, флавоноидов, органических и гидроксикоричных кислот, дубильных веществ, суммарного содержания полисахаридов) в листьях ольхи разных способов консервации. Методом хромато-масс-спектрометрии изучены в хлороформном и ацетонитрильном извлечении из сырья. Установлено, что состав соединений для ольхи двух видов практически совпадает и представлен 28 соединениями, среди которых в качестве характерных веществ (маркеров) могут рассматриваться хумулан-1,6-диен-3-ол, лупеол (ольха черная), лупеон (ольха серая), β -амирин, γ -ситостерол, транс-лонгипинокарвеол. Впервые в извлечении из листьев ольхи серой и черной установлено наличие эвгенола, ранее описанного только для сырья *Alnus pendula*. Разработаны и апробированы методики подтверждения подлинности и оценки количественного содержания флавоноидов, содержание которых составило в свежих листьях до 2,51%, в замороженных листьях до 2,31%, тритерпеновых сапонинов, содержание которых варьирует от 1,23 до 1,39% в пересчете на олеаноловую кислоту.

4. Определены показатели качества листьев ольхи серой и черной. Учитывая близкие значения числовых показателей листьев ольхи двух видов, проведено определение числовых показателей на смесь листьев, установлены их нормы для включения в проект ФС «Ольхи листья».

5. Получены водные и водно-спиртовые извлечения из листьев ольхи серой и черной, в которых был установлен качественный состав и проведено количественное определение дубильных веществ, флавоноидов, тритерпеновых сапонинов. Изучена антимикробная активность извлечений из листьев ольхи. Установлено, что все изучаемые извлечения из листьев ольхи проявляют антимикробное действие в отношении 9 штаммов микроорганизмов.

6. Оценена адсорбционная способность образцов жмыхов сырья соплодий и листьев ольхи видов *Alnus incana* и *A. glutinosa* по метиленовому синему и желатину, по сравнению с аналогичными показателями традиционных энтеросорбентов – препарата «Полифепан» и микрокристаллической целлюлозы. Технологическая обработка жмыхов, направленная на увеличение пористости получаемых сорбентов, позволила повысить их адсорбционную способность. Полученные результаты позволяют прогнозировать возможность безотходной переработки листьев ольхи с использованием жмыха ольхи для создания инновационного растительного энтеросорбента.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты исследования позволяют эффективно и рационально использовать в медицине и фармацевтической практике новое ЛРС – листья ольхи серой и черной. Разработанные в ходе исследований подходы к стандартизации сырья могут быть использованы в учебном процессе по курсу «Фармакогнозия» для высших учебных заведений. Особо важным представляется, приводимое автором научное обоснование введения в отечественную номенклатуру листьев ольхи серой и черной, что позволит расширить ассортимент российского ЛРС.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Проведенные исследования могут использоваться для последующего совершенствования методов определения подлинности и доброкачественности листьев ольхи серой и черной и разрабатываемых препаратов на их основе.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Нестеров, Г. В.** Анализ влияния рекламы лекарственных средств на выбор потребителя / **Г. В. Нестеров** // ADVANCED SCIENCE. Сборник статей V Международной научно-практической конференции. – Пенза: «Наука и Просвещение», 2018. – С. 216-219.
2. Изучение качественного состава извлечений из листьев ольхи *alnus incana* (l.) *moench* и *alnus glutinosa* (l.) *gaertn* / **Г. В. Нестеров**, Т. М. Литвинова, Т. Ю. Ковалева, Н. В. Бобкова // Фундаментальные и прикладные научные исследования: актуальные вопросы, достижения и инновации: сборник статей XXVII Международной научно-практической конференции – Пенза: МЦНС «Наука и Просвещение», 2019. – 274 с.
3. **Нестеров, Г. В.** Сравнительная оценка товароведческих показателей листьев ольхи разных видов / **Г. В. Нестеров**, Т. М. Литвинова // Фармацевтическое дело и технология лекарств. – 2020. – № 6. – С. 73-78.
4. **Нестеров, Г. В.** Влияние процесса ферментации на показатели качества листьев ольхи видов *alnus incana* (l.) *moench* и *alnus glutinosa* (l.) *gaerth* / **Г. В. Нестеров**, Т. М. Литвинова, С. В. Кондрашев // **Медико-фармацевтический журнал Пульс**. – 2020. – № 3(22). – С. 67-71.
5. **Нестеров, Г. В.** Изучение морфологических признаков листьев ольхи фармакопейных видов / **Г. В. Нестеров**, Т. М. Литвинова, Л. А. Васалатий // **Медико-фармацевтический журнал Пульс**. – 2021. – № 7(23). – С. 129-134.
6. **Нестеров, Г. В.** Оценка влияния режима изготовления на качество водных извлечений из листьев ольхи видов *alnus incana* (l.) *moench* и *a. glutinosa* (l.) *gaerth* / **Г. В. Нестеров**, Т. М. Литвинова // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2021. – № 3(33). – С. 49-54.
7. **Нестеров, Г. В.** Сравнительный анализ некоторых товароведческих характеристик и технологических параметров листьев ольхи серой и черной / **Г. В. Нестеров**, Н. В. Нестерова // **Медико-фармацевтический журнал Пульс**. – 2021. – № 2(23). – С. 69-73.
8. **Нестеров, Г. В.** Использование метода тонкослойной хроматографии для определения подлинности соплодий и листьев ольхи разных видов / **Г. В. Нестеров**, Т. М. Литвинова, С. В. Чернова // Наукосфера. – 2021. – № 6-1. – С. 40-43.
9. **Нестеров, Г. В.** Анализ полисахаридов ольхи видов *alnus incana* *moench*. и *a. glutinosa* *gaerth* / **Г. В. Нестеров**, Т. М. Литвинова // Наукосфера. – 2021. – № 11(2). – С. 16-18.
10. **Нестеров, Г. В.** Сравнительный анализ некоторых показателей качества жидкого экстракта соплодий и листьев ольхи фармакопейных видов / **Г. В. Нестеров** // Новые проблемы медицинской науки и перспективы их решений. XVI научно-практическая конференция молодых учёных и студентов с международным участием ГОУ «ТГМУ им. Абуали ибни Сино»,

посвященная 30-летию Государственной независимости Республики Таджикистан и годам развития села, туризма и народных ремесел (2019-2021), Душанбе. – 2021. – С. 354.

11. **Нестеров, Г. В.** Оценка содержания суммы полифенольных соединений в сухом экстракте листьев ольхи видов *alnus incana* (L.) *alnus glutnosa* (L.) *gaertn* / **Г. В. Нестеров**, Т. М. Литвинова // Материалы международной научно-практической конференции «современное состояние фармацевтической отрасли: проблемы и перспективы», Ташкент. – 2021. – С. 154-155.

12. **Нестеров, Г. В.** Изучение сорбционных свойств отходов переработки плодов и листьев ольхи видов *Alnus incana*(l.) Moench *A.glutinosa* (l.) Gaerth / **Г. В. Нестеров**, Т. М. Литвинова // **Медико-фармацевтический журнал Пульс**. – 2021. – Т. 23. – № 12. – С. 112-118.

13. Идентификация и количественное определение тритерпеновых сапонинов в соплодиях и листьях ольхи различных видов / **Г. В. Нестеров**, Т. М. Литвинова, В. М. Матвеевко, Н. В. Нестерова, Ф. Ш. Сулейманова // **Вестник Московского университета. Серия 2: Химия**. – 2022. – № 1(63). – С. 76-82. [Scopus]