

На правах рукописи



Филимонова Светлана Михайловна

**Изучение состава и содержания фитостеролов в экстрактах лекарственного
растительного сырья и перспективных видах**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2022

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

Щепочкина Ольга Юрьевна

Официальные оппоненты:

Белоусов Михаил Валерьевич, доктор фармацевтических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтического анализа, заведующий кафедрой

Перова Ирина Борисовна, кандидат фармацевтических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи, лаборатории метаболомного и протеомного анализа, старший научный сотрудник

Ведущая организация: Акционерное общество «Всесоюзный научный центр по безопасности биологически активных веществ»

Защита диссертации состоится «21» декабря 2022 г. в 13.00 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 Центральной научной медицинской библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) (119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1) и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2022 года

Ученый секретарь

диссертационного совета ДСУ 208.002.02

доктор фармацевтических наук, профессор



Дёмина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Лекарственное растительное сырье является источником широкого спектра биологически активных соединений, обладающих разнообразными фармакологическими эффектами.

Фитостеролы – это высокомолекулярные соединения растительного происхождения, имеющие структурное сходство с холестерином. Употребление фитостеролов позволяет снизить содержание холестерина в крови, что является профилактикой сердечно-сосудистых заболеваний и подтверждено данными об эффективности и безопасности. Изучена эффективность фитостеролов для облегчения симптомов доброкачественной гиперплазии предстательной железы. Препараты, содержащие спиртовой экстракт плодов пальмы Сереноа или пальмы ползучей (*Serenoa repens* Hook.F.), представлены на российском рынке под торговыми названиями «Простамол уно», «Пермиксон», «Просталлант», «Простагут», «Пальмапрост» и другими. Описаны такие фармакологические эффекты фитостеролов, как противораковый, ангиогенный, противовоспалительный, анальгетический, иммуномодулирующий. Изучение других видов фармакологической активности фитостеролов, например, антиамилазной, является актуальной задачей.

Фитостеролы – это важные компоненты питания. Ими наиболее богаты растительные масла, овощи, семена, зерновые, орехи.

В качестве источника фитостеролов используют бобы сои (*Glycine max*) – 0,2-0,3%, плоды пальмы Сереноа (*Serenoa repens* Hook.F.) – 0,015-0,05%. Фитостеролы обнаружены в лекарственных растениях из семейств Бобовых, Сложноцветных, Розоцветных и других, во всех органах и морфологических группах сырья. Согласно литературным данным об отечественных и зарубежных исследованиях, определение содержания фитостеролов было проведено в большом количестве лекарственных растений зарубежной флоры. Однако, удельный вес работ, посвящённых изучению качественного и количественного состава фитостеролов в растениях, произрастающих на территории Российской Федерации, невелик.

Согласно требованиям Европейской фармакопеи, по наличию β -ситостерола стандартизируют такое лекарственное растительное сырье (ЛРС), как эхинацеи бледной корни (*Echinaceae palliae radix*), сливы африканской кора (*Pruni africanae cortex*), пальмы Сереноа плоды (*Sabalisa serrulatae fructus*), иглицы корневища (*Rusci rhizoma*) (раздел «Подлинность»). Британская фармакопея регламентирует проводить стандартизацию по наличию β -ситостерола таких видов лекарственного сырья, как эхинацеи бледной корни (*Echinaceae palliae radix*), эхинацеи пурпурной корни (*Echinacea purpurea*), сливы африканской кора (*Prunus africana*), витании снотворной кора (*Withania somnifera* L.) (раздел «Подлинность»). По требованиям

Государственной Фармакопеи РФ ни одно лекарственное растительное сырье не стандартизуют по содержанию фитостеролов.

Изучение содержания БАВ группы фитостеролов в сырье лекарственных растений, произрастающих на территории Российской Федерации, позволит использовать отечественную сырьевую базу для получения биологически активных веществ широкого спектра фармакологической активности. В связи с этим разработка специфических и достоверных методов контроля качества лекарственного растительного сырья, содержащего фитостеролы, является актуальной задачей.

Степень разработанности темы исследования

Начало изучения фитостеролов относится к 30 гг XX века. В 1982 г Мэттсон и соавт. впервые описали гипохолестеринемическое действие β -ситостерола. К 1973 г было изучено уже 44 фитостерола, содержащихся в растениях. В 2002 г Моро и соавт. описали основные химические и физические свойства, а также методы анализа соединений данной группы. В настоящее время известно более 250 фитостеролов. Есть данные о многочисленных фармакологических эффектах фитостеролов, например, способности снижать уровень холестерина в крови и облегчать симптомы при гиперплазии простаты, однако, нет подтверждения их антиамилазной активности.

Рядом зарубежных ученых проведены исследования содержания фитостеролов в широком спектре лекарственного растительного сырья (ЛРС), но информация по перспективным видам лекарственных растений, произрастающих на территории Российской Федерации, отсутствует.

Цель исследования

Цель исследования – провести сравнительное фитохимическое изучение лекарственного растительного сырья, содержащего фитостеролы, с использованием современных методов анализа.

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

1. Провести информационно-аналитическое исследование данных научной литературы о фармакологической активности, распространении фитостеролов в лекарственном растительном сырье, способах их экстракции, а также методах качественного и количественного анализа.
2. Экспериментально подобрать оптимальные условия извлечения фитостеролов из ЛРС и разработать методику качественной оценки содержания фитостеролов в извлечениях из ЛРС методом ТСХ.
3. Разработать и валидировать методику количественного определения суммы фитостеролов в пересчете на β -ситостерол в извлечениях из ЛРС методом спектрофотометрии.
4. Разработать и валидировать методику количественного определения фитостеролов в извлечениях из ЛРС методом ГХ-МС. Оценить и сравнить количественное содержание

фитостеролов в извлечениях из ЛРС с целью выявления наиболее перспективных источников фитостеролов.

5. Провести анализ стабильности фитостеролов в составе спиртовых извлечений из ЛРС в течение 6 месяцев в условиях хранения при температуре 20°C.

6. Провести анализ антиамилазной активности спиртовых извлечений (экстрактов) из ЛРС и β -ситостерола с использованием метода спектрофотометрии.

Научная новизна

Проведена сравнительная оценка содержания фитостеролов в ЛРС 12 видов растений, произрастающих на территории Российской Федерации. Для этого разработана методика качественного анализа фитостеролов в ЛРС хроматографическими методами (ТСХ, ГХ-МС) и спектрофотометрическим методом. Разработана и валидирована методика количественного определения суммы фитостеролов в пересчете на β -ситостерол в спиртовых извлечениях из ЛРС методом спектрофотометрии. Разработана и валидирована методика количественного определения фитостеролов в спиртовых извлечениях из ЛРС методом ГХ-МС. Изучена антиамилазная активность спиртовых извлечений, полученных из 12 видов ЛРС. Доказана антиамилазная активность β -ситостерола.

Теоретическая и практическая значимость

Результаты проведенных исследований расширяют теоретические знания о составе и возможных фармакологических эффектах фармакопейного лекарственного растительного сырья, а также сырья растений перспективных видов, содержащего фитостеролы. Разработанные в ходе диссертационного исследования методики могут являться основой для дальнейшего изучения содержания фитостеролов в ЛРС и антиамилазной активности биологически активных соединений.

По результатам проведенных испытаний разработаны методики качественной и количественной оценки содержания фитостеролов в лекарственном растительном сырье. Проведено сравнительное фитохимическое изучение 12 видов ЛРС по содержанию суммы фитостеролов в пересчете на β -ситостерол. Проведено сравнительное изучение антиамилазной активности спиртовых извлечений (экстрактов) из ЛРС и доказана антиамилазная активность β -ситостерола.

Методология и методы исследования

Методология диссертационного исследования основана на поиске, систематизации и анализе научных данных о строении, физико-химических и фармакологических свойствах фитостеролов, обосновании выбора методов, способов пробоподготовки и условий хроматографического (ГХ-МС и ТСХ) и спектрофотометрического качественного и

количественного определения фитостеролов в лекарственном растительном сырье и определения антиамилазной активности.

При выполнении работы нами были использованы методы тонкослойной хроматографии, спектрофотометрии, ГХ-МС, качественные реакции. Валидацию разработанных методик и статистическую обработку результатов проводили в соответствии с требованиями ГФ XIV и с применением программы Microsoft Excel.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Результаты выбора оптимальных условий проведения качественного исследования фитостеролов в спиртовых извлечениях из ЛРС методом тонкослойной хроматографии.
2. Разработанные методики количественного определения суммы фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол в спиртовых извлечениях из ЛРС методами спектрофотометрии и ГХ-МС.
3. Результаты количественного определения суммы фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол в 12 видах ЛРС. Экспериментальными данными подтверждено высокое содержание фитостеролов в плодах люпина многолистного (*Lupinus polyphillus* Lindl.), траве козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.) и траве чины луговой (*Lathyrus pratensis* L.), которые являются перспективными растительными источниками изучаемой группы БАВ.
4. Результаты изучения стабильности фитостеролов в спиртовых извлечениях из ЛРС в условиях хранения при 20°C в течение 6 месяцев.
5. Результаты количественной оценки антиамилазной активности спиртовых извлечений из ЛРС и β -ситостерола с использованием метода спектрофотометрии.
6. Доказательство антиамилазной активности β -ситостерола.

Степень достоверности результатов проведенных исследований

Степень достоверности результатов диссертационной работы подтверждается применением современных физико-химических методов фармацевтического анализа (спектрофотометрических, хроматографических); использованием поверенного оборудования и реактивов; обширностью экспериментального материала (объектом исследования послужили 12 видов лекарственного растительного сырья); актами проверки первичной документации; изучением и использованием в качестве теоретической базы трудов зарубежных и отечественных ученых; публикацией материалов исследования в открытой печати и докладах на научно-практических конференциях. Валидацию разработанных аналитических методик проводили согласно требованиям ОФС «Валидация аналитических методик» ГФ РФ XIV, оценивая предел обнаружения, предел количественного определения, линейность, правильность и прецизионность. Статистическая обработка результатов исследований проводилась согласно требованиям ОФС «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» ГФ РФ XIV с помощью программного обеспечения Microsoft Excel.

Доклад, посвященный определению антиамилазной активности спиртовых извлечений из ЛРС и доказательству антиамилазной активности β -ситостерола «Изучение антидиабетического действия экстрактов лекарственных растений семейства Бобовые (Fabaceae)» отмечен дипломом лауреата конкурса научных работ молодых ученых в рамках XXIX Российского Национального конгресса «Человек и лекарство» (2022).

Апробация результатов исследования

Основные положения работы были доложены на конференции «Актуальные вопросы медицинской науки» (Ярославль, 2021 г.), на 29 Российском Национальном Конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2022 г.), конференции ЗКМУ им. Марата Оспанова (Казахстан, 2022 г.). Апробация работы прошла на заседании кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (протокол № 2 от 07.09.2022).

Личный вклад автора

Автором под руководством научного руководителя определена тема исследования, поставлена цель и сформулированы задачи. Автором лично был проведен поиск и анализ отечественных и зарубежных научных источников, разработан план экспериментальной работы, выбраны объекты исследования, произведена заготовка ЛРС на территории Ботанического сада ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) (солодки уральской трава, термопсиса ланцетного трава, козлятника восточного трава, донника лекарственного трава) и в Подмосковье (чины трава и люпина многолистного плоды).

В диссертационной работе представлены результаты разработки методики количественного определения фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол методом спектрофотометрии, ТСХ-анализа спиртовых извлечений из ЛРС и анализа антиамилазной активности спиртовых извлечений из ЛРС и β -ситостерола, полученных автором самостоятельно в научно-образовательной лаборатории кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института фармации имени А.П. Нелюбина (заведующий кафедрой – Раменская Г.В.) ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Разработка методики идентификации и количественного определения фитостеролов в ЛРС методом ГХ-МС были проведены автором совместно с сотрудником центра «Цифрового биодизайна и персонализированного здравоохранения» ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) к.х.н. Кузнецовым Р.М.

Автором лично была проведена статистическая обработка результатов исследований и валидации аналитических методик, под руководством научного руководителя Щепочкиной О.Ю. написаны главы диссертационной работы и оформлены научные статьи.

Внедрение результатов в практику

Разработанные методики и результаты количественного определения фитостеролов в ЛРС использованы в учебном процессе кафедры фармацевтического естествознания ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет). Методика количественного определения суммы фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол в спиртовых извлечениях из ЛРС внедрена в контрольно-аналитической лаборатории ООО «Центр фармацевтической аналитики».

Соответствие диссертации паспорту специальности

Научные положения диссертации соответствуют п. 2, 3, 6 паспорта научной специальности 3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтической науки

Диссертационная работа выполнена в соответствии с комплексной научной темой кафедры фармацевтической и токсикологической химии имени А.П. Арзамасцева Института фармации имени А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) «Основные направления создания и оценки качества лекарственных средств».

Публикации

По результатам исследования автором опубликовано 5 работ, в том числе 3 научных статьи в журналах, включенных в международные, индексируемые базы данных Chemical Abstracts, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 2 публикации в сборниках материалов международных и всероссийских научных конференций (из них 1 зарубежная конференция).

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа изложена на 121 странице, состоит из введения, литературного обзора, экспериментальной части в виде 4 глав, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Работа иллюстрирована 23 рисунками, содержит 17 таблиц, библиография включает 164 источника, в том числе 154 зарубежных и 10 отечественных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ

Объекты и методы исследования

Объектом исследования являлось лекарственное растительное сырье растений семейства Бобовые (*Fabaceae*) и Яснотковые (*Lamiaceae*): солодки корни (*Glycyrrhizae radices*), донника трава (*Meliloti herba*), стальника полевого корни (*Ononis arvensis radices*), сенны листья (*Sennae folia*), термопсиса ланцетного трава (*Thermopsis lanceolatae herba*), бутоны софоры японской (*Sophorae japonicae alabastra*) (семейство Бобовые); шалфея лекарственного листья (*Salviae officinalis folia*) (семейство Яснотковые).

Также для исследования использовали нефармакопейное сырье растений семейства Бобовые (*Fabaceae*), качество которых регламентируется зарубежными фармакопеями или лекарственные свойства которых описаны в литературных источниках: трава клевера лугового (*Trifolium pratense* L.), трава козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.), листья солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.), плоды люпина многолистного (*Lupinus polyphillus* Lindl.), трава чины луговой (*Lathyrus pratensis* L.).

Из сырья готовили спиртовые извлечения 1:1 (из 1 г сырья получали 1 мл спиртового извлечения) методом противоточной периодической экстракции. В качестве экстрагента использовали спирт этиловый 95%, 96% (ФС.2.1.0036.15 Спирт этиловый 95 %, 96 %).

Для анализа методом ТСХ использовали пластинки для тонкослойной хроматографии Kiesergel 60 F254 20x20 cm, MERCK, Дармштадт, Германия, спектрофотометрическое определение фитостеролов и антиамилазной активности проводили с использованием спектрофотометра Agilent Cary 100 UV-Vis, кювет с толщиной поглощающего слоя 10 мм. Анализ методом ГХ-МС проводили с помощью газового хроматографа 7820А Agilent Technologies, США с колонкой HP-5MS, 30м×0,25мм×0,25мкм, масс-селективный детектор 5977 с квадрупольным масс-анализатором, автодозатор модели G4513. Стандарт – β-ситостерол Fluka, Швеция, CAS N 83-46-5.

Для количественного определения ингибирующей амилазу активности спиртовых извлечений использовали методику, основанную на реакции свободных сахаров с реактивом динитросалициловой кислотой (ДНС-реактивом). Спиртовое извлечение или раствор стандарта β-ситостерола инкубировали с раствором амилазы, затем добавляли крахмал, снова инкубировали. Гидролиз останавливали добавлением ДНС-реактива и нагреванием на водяной бане. Оптическую плотность раствора измеряли при длине волны около 540 нм. Раствор сравнения – дистиллированная вода. Для того чтобы исключить влияние экстрагента (спирта) на фермент, а также компонентов спиртового извлечения на ДНС-реактив, параллельно проводили ряд контрольных опытов.

Валидацию аналитических методик проводили согласно требованиям ГФ XIV, ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик». Статистическую обработку результатов анализа количественного содержания фитостеролов проводили согласно требованиям ГФ XIV, ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического опыта», с помощью программы Microsoft Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Обоснование выбора экстрагента и разработка методики качественного определения фитостеролов в спиртовых извлечениях из ЛРС

Выбор экстрагента обоснован физико-химическими свойствами фитостеролов и проведением предварительного испытания, в ходе которого проводили экстракцию 40%, 70% и 95% спиртом. Фитостеролы методом ТСХ были обнаружены только в извлечении, полученном с использованием 95% этанола. Таким образом, наиболее полная экстракция фитостеролов из растительного сырья возможна с использованием 95% спирта, что объясняется липофильностью данной группы БАВ.

Качественный анализ фитостеролов проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ). Наиболее эффективное разделение фитостеролов наблюдалось в системах гексан : этилацетат (3:1); гексан : этилацетат : уксусная кислота ледяная (20:9:1). R_f β -ситостерола в случае использования первой системы растворителей составлял примерно 0,55; второй системы – 0,8. Для детектирования фитостеролов использовали три методики:

- 1) Спиртовой раствор ванилина сернокислого с последующим нагреванием до 100-105°C. При просматривании в дневном свете пятно β -ситостерола окрашено в пурпурный цвет.
- 2) 10% раствор серной кислоты спиртовой с последующим нагреванием до 100-105°C. При просматривании при дневном свете пятно β -ситостерола окрашено в красно-пурпурный цвет.
- 3) УФ-свет при длине волны 254 нм после обработки пластинки 10% раствором серной кислоты спиртовым. Пятно β -ситостерола светится красным цветом.

В случае хроматограммы спиртового извлечения травы солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis Fisch.*) пятно фитостерола замаскировано другим БАВ, после вертикального хроматографирования проводили разделение по ширине пластинки в системе растворителей гексан : этилацетат : уксусная кислота ледяная (20:9:1).

Количественный анализ суммы фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол методом спектрофотометрии

Для оценки содержания фитостеролов в ЛРС была разработана спектрофотометрическая методика, в основе которой лежит реакция фитостеролов с ванилином в среде кислоты серной концентрированной.

Пробоподготовка заключалась в щелочном гидролизе и жидко-жидкостной экстракции липофильных соединений гексаном. Предварительно было установлено, что максимум светопоглощения фитостеролов в спиртовых извлечениях из ЛРС после реакции с раствором ванилина серноокислого соответствует максимуму поглощения раствора стандарта β -ситостерола с ванилином и находится при длине волны 545 нм, в связи с чем измерение проводили при длине волны 545 нм. В качестве раствора сравнения использовали спирт этиловый 95%. Количественное определение проводили методом калибровочного графика.

Результаты количественного определения суммы фитостеролов в пересчете на β -ситостерол представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты количественного определения суммы фитостеролов в пересчете на β -ситостерол (мг на г сырья)

Сырье	Содержание фитостеролов, мг/г (n=5)	RSD, %
солодки корни (<i>Glycyrrhizae radices</i>)	3,42 ± 0,23	6,83
донника лекарственного трава (<i>Meliloti herba</i>)	21,07 ± 0,49	6,3
стальника полевого корни (<i>Ononis arvensis radices</i>)	4,36 ± 0,23	5,42
сенны листья (<i>Sennae folia</i>)	15,03 ± 0,45	2,98
термопсиса ланцетного трава (<i>Thermopsideis lanceolatae herba</i>)	4,25 ± 0,09	2,16
софоры японской бутоны (<i>Sophorae japonicae alabastra</i>)	8,44 ± 0,55	6,56
шалфея лекарственного листья (<i>Salviae officinalis folia</i>)	19,78 ± 0,89	4,49
трава клевера лугового (<i>Trifolium pratense</i> L.)	6,44 ± 0,23	3,67
трава козлятника восточного (<i>Galega orientalis</i> Lam.)	12,24 ± 0,77	6,31
листья солодки уральской (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.)	2,74 ± 0,12	4,43
плоды люпина многолистного (<i>Lupinus polyphillus</i> Lindl.)	10,21 ± 0,47	4,59
трава чины луговой (<i>Lathyrus pratensis</i> L.)	7,51 ± 0,28	3,74

Валидацию методики проводили по показателям «Специфичность», «Предел обнаружения», «Предел количественного определения», «Линейность», «Правильность», «Прецизионность» согласно требованиям ОФС ГФ XIV. Предел обнаружения и предел

количественного определения составили 0,08 мкг/мл и 0,24 мкг/мл, соответственно. Методика является правильной и прецизионной в диапазоне определяемых концентраций β -ситостерола от 0,2 мкг/мл до 1,8 мкг/мл. Значение RSD, % не превышало 6,5%, относительная погрешность $|\varepsilon|$, % не более 4,1%.

Количественное определение суммы фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол и идентификация индивидуальных фитостеролов методом ГХ-МС

Для разделения компонентов спиртовых извлечений использовали колонку HP-5MS, длина 30 м, внутренний диаметр 0,25 мм, толщина плёнки неподвижной фазы, содержащей 5% фенил-, 95% метилполисилоксана, 0,25 мкм (Agilent Technologies). Газ носитель – гелий, температура: 280°C. В качестве испытуемого раствора использовали спиртовое извлечение из лекарственного растительного сырья. Пробоподготовка заключалась в центрифугировании в течение 5 минут со скоростью 20000 об/мин на ультрацентрифуге Eppendorf 5427 (Германия). Температурный режим хроматографирования представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Температурная программа хроматографирования

(Начало)	50 °С
Время выдержки	2 мин
После цикла	50 °С
Программа	
#1 Скорость	10 °С/мин
#1 Значение	150 °С
#1 Время выдержки	0 мин
#2 Скорость	15 °С/мин
#2 Значение	280 °С
#2 Время выдержки	39,333 мин

Объем вводимой пробы составлял 1 мкл. Объем шприца автоинжектора – 10 мкл. Режим введения пробы с делением потока с соотношением 1:20. Температура 280°C. Использовали масс-селективное детектирование. Ионизацию проводили методом электронного удара, температура источника ионов 230°C, температура квадруполя 150°C. Массы определяемых ионов находились в диапазоне от 29 до 550 m/z. В качестве стандарта использовали раствор β -ситостерола (1 мкг/мл). Его масс-спектр представлен на рисунке 1.

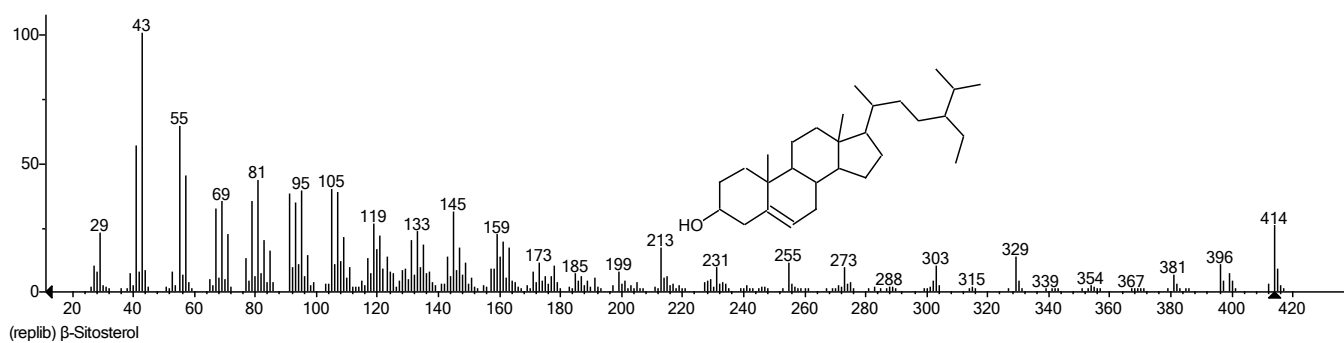


Рисунок 1 – Масс-спектр β -ситостерола

Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения ChemStationE 02.00. Помимо β -ситостерола в спиртовых извлечениях были обнаружены кампестерол и стигмастерол. Идентификацию компонентного состава (качественный анализ) проводили по библиотеке полных масс-спектров NIST-14 и соответствующим значениям линейных хроматографических индексов Ковача. Хроматограмма травы козлятника восточного представлена на рисунке 2. Относительное содержание компонентов смеси (количественный анализ) определяли вычислением соотношения площадей хроматографических пиков (методом внутренней нормализации). Результаты количественного анализа фитостеролов в растительном сырье представлены в таблице 3.

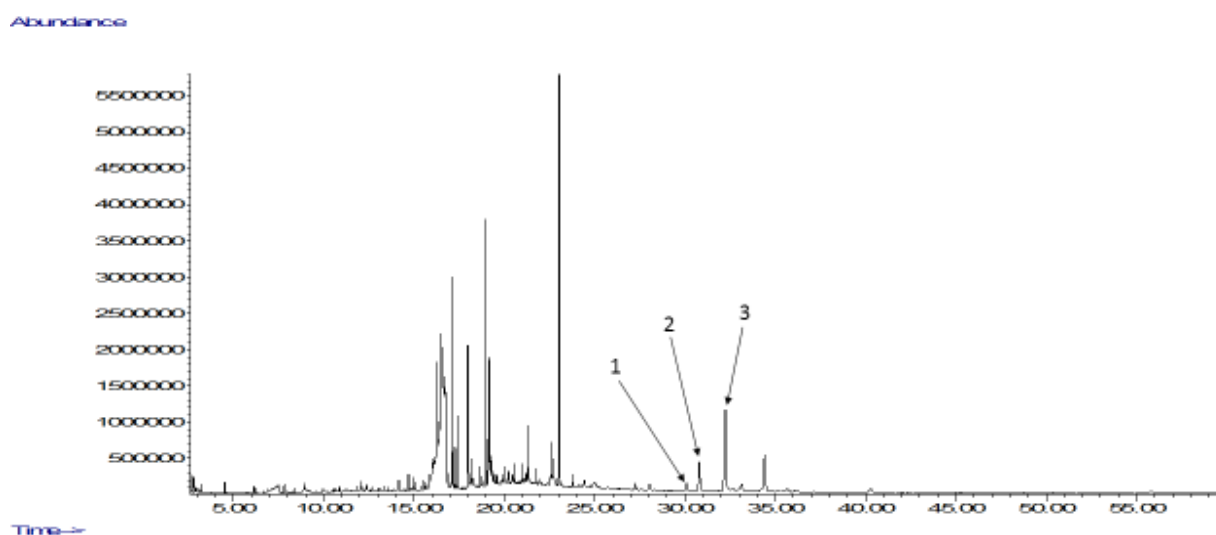


Рисунок 2 – хроматограмма спиртового извлечения травы козлятника восточного, полученная методом ГХ/МС. 1 – кампестерол, время удерживания 30,089 мин; 2 – стигмастерол, время удерживания 30,797 мин; 3 - β -ситостерол, время удерживания 32,237 мин

Таблица 3 – Времена удерживания и количественное содержание (мг/г) фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол в сырье

Сырье	β -ситостерол		Стигмастерол		Кампестерол		Суммарное содержание фитостеролов, мг/г
	RT, мин	мг/г	RT, мин	мг/г	RT, мин	мг/г	
солодки корни (<i>Glycyrrhizae radices</i>)	32,211	2,64 \pm 0,03	30,79 9	0,499 \pm 0,02	-	-	3,14 \pm 0,04
донника лекарственного трава (<i>Meliloti herba</i>)	32,175	1,29 \pm 0,01	30,77 3	0,306 \pm 0,01	30,06 7	0,193 \pm 0,02	1,79 \pm 0,01
стальника полевого корни (<i>Ononis arvensis radices</i>)	32,185	2,04 \pm 0,14	30,77 9	0,731 \pm 0,09	30,07 2	0,334 \pm 0,09	3,10 \pm 0,13
сенны листьев (<i>Sennae folia</i>)	32,218	2,90 \pm 0,13	30,80 4	1,499 \pm	30,09 3	0,601	5,00 \pm 0,12
термопсиса ланцетного трава (<i>Thermopsis lanceolatae herba</i>)	32,184	0,74 \pm 0,15	30,79 0	0,63 \pm 0,14	30,07 5	0,33 \pm 0,10	1,69 \pm 0,14
софоры японской бутоны (<i>Sophora japonica L.</i>)	32,244	2,79 \pm 0,13	-	-	-	-	2,79 \pm 0,13
шалфея лекарственного листа (<i>Salviae officinalis folia</i>)	32,219	1,331 \pm 0,04	-	-	-	-	1,33 \pm 0,04
трава клевера лугового (<i>Trifolium pratense L.</i>)	32,236	3,50 \pm 0,15	30,79 4	0,58 \pm 0,14	30,08 9	0,53 \pm 0,09	4,62 \pm 0,15
трава козлятника восточного (<i>Galega orientalis Lam.</i>)	32,237	6,65 \pm 0,15	30,79 7	2,17 \pm 0,10	30,08 9	0,610 \pm 0,15	9,43 \pm 0,14

Продолжение Таблицы 3

листья солодки уральской (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.)	32,250	2,06 ± 0,13	30,833	0,334 ± 0,10	-	-	2,380 ± 0,12
плоды люпина многолистного (<i>Lupinus polyphillus</i> Lindl.)	32,222	4,34 ± 0,14	30,797	1,72 ± 0,10	30,092	2,04 ± 0,13	8,10 ± 0,14
трава чины луговой (<i>Lathyrus pratensis</i> L.)	32,204	5,61 ± 0,22	-	-	-	-	5,61 ± 0,22

Валидацию методики проводили согласно ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» по следующим показателям: специфичность, линейность, правильность и прецизионность, предел количественного определения. Время удерживания стандартного раствора β -ситостерола 32,171 мин совпадает с временами удерживания β -ситостерола в извлечениях из растительного сырья. Предел количественного определения составляет не менее 0,1 нг. Диапазон линейной зависимости площади хроматографического пика от концентрации анализируемого вещества составил 0,05 мг/мл - 50,00 мг/мл. Коэффициент корреляции $r = 0,9928$, уравнение сглаживающей прямой $y = 22635x + 610,2$.

Для определения правильности и прецизионности методики анализировали стандартные растворы β -ситостерола с концентрациями 0,05 мг/мл, 5,0 мг/мл и 50,0 мг/мл. Каждый анализ проводили пятикратно. Полученные значения подвергали статистической обработке, рассчитывали относительное стандартное отклонение (RSD, %) и относительную погрешность ($\epsilon, \%$). Значение RSD, % не превышало 0,51, $\epsilon, \%$ - 3,8 %.

Анализ стабильности фитостеролов в составе спиртовых извлечений из лекарственного растительного сырья

Фитостеролы относятся к термически нестабильным веществам. Поэтому целесообразно проведение изучения стабильности фитостеролов в составе спиртовых извлечений из лекарственного растительного сырья в условиях хранения при комнатной температуре (20°C), в защищённом от света месте. Количественное определение фитостеролов проводили методом ГХ-МС во временных точках 0 – после приготовления, 3 месяца и 6 месяцев. Помимо содержания фитостеролов проводили контроль таких параметров спиртовых извлечений как внешний вид, содержание спирта этилового, содержание сухого остатка. Результаты изучения стабильности представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Изучение стабильности фитостеролов в составе спиртовых извлечений из лекарственного растительного сырья

Сырье	Временные точки	Органолептические свойства			Содержание суммы фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол, мг/мл (n=5) метод – ГХ-МС	Содержание спирта, % (n=5)	Сухой остаток, % (n=5)
		Цвет	Прозрачность	Запах			
солодки корни (<i>Glycyrrhizae radices</i>)	после приготовления	Темно-коричневый	Прозрачный	Сильный, характерный	$3,140 \pm 0,04$	$79,58 \pm 0,97$	$5,76 \pm 0,15$
	3 месяца	Темно-коричневый	Прозрачный	Сильный, характерный	$3,021 \pm 0,17$	$75,35 \pm 1,01$	$6,27 \pm 0,07$
	6 месяцев	Темно-коричневый	Прозрачный	Сильный, характерный	$3,010 \pm 0,09$	$71,21 \pm 0,97$	$6,92 \pm 0,21$
донника лекарственного трава (<i>Meliloti herba</i>)	после приготовления	Темно-зеленый	Прозрачный	Характерный	$1,793 \pm 0,01$	$80,66 \pm 1,9$	$2,90 \pm 0,12$
	3 месяца	Темно-зеленый	Прозрачный	Характерный	$1,755 \pm 0,03$	$75,19 \pm 1,54$	$3,46 \pm 0,09$
	6 месяцев	Буро-зеленый	Наблюдается легкая опалесценция	Характерный	$1,776 \pm 0,01$	$72,42 \pm 1,15$	$4,08 \pm 0,17$

Продолжение Таблицы 4

стальника полевого корни (<i>Ononis arvensis radices</i>)	после приготовления	Оранжево- коричневый	Прозрачный	Сильный, характерный	$3,103 \pm 0,13$	$77,86 \pm 1,17$	$4,53 \pm 0,52$
	3 месяца	Оранжево- коричневый	Прозрачный	Сильный, характерный	$3,100 \pm 0,09$	$73,48 \pm 1,52$	$4,95 \pm 0,21$
	6 месяцев	Оранжево- коричневый	Наблюдается легкая опалесценция	Сильный, характерный	$3,097 \pm 0,04$	$70,01 \pm 1,65$	$5,03 \pm 0,09$
сенны листья (<i>Sennae folia</i>)	после приготовления	Темно- зеленый	Прозрачный	Характерный	$5,004 \pm 0,12$	$78,04 \pm 1,53$	$7,69 \pm 0,07$
	3 месяца	Темно- зеленый	Прозрачный	Характерный	$5,000 \pm 0,10$	$74,61 \pm 1,79$	$8,26 \pm 0,15$
	6 месяцев	Буро- зеленый	Наблюдается легкая опалесценция	Характерный	$4,991 \pm 0,27$	$70,97 \pm 1,73$	$8,83 \pm 0,10$
термопсиса ланцетного трава (<i>Thermopsidis lanceolatae herba</i>)	после приготовления	Темно- зеленый	Прозрачный	Характерный	$1,697 \pm 0,14$	$81,43 \pm 1,67$	$4,68 \pm 0,13$
	3 месяца	Темно- зеленый	Прозрачный	Характерный	$1,683 \pm 0,05$	$77,42 \pm 1,90$	$5,94 \pm 0,18$
	6 месяцев	Буро- зеленый	Наблюдается легкая опалесценция	Характерный	$1,680 \pm 0,06$	$72,21 \pm 0,96$	$6,17 \pm 0,22$

Продолжение Таблицы 4

софоры японской бутоны (<i>Sophorae japonicae alabastra</i>)	после приготовления	Темно- зеленый	Прозрачный	Слабый специфический	$2,790 \pm 0,13$	$79,76 \pm 1,80$	$5,58 \pm 0,24$
	3 месяца	Темно- зеленый	Прозрачный	Слабый специфический	$2,790 \pm 0,13$	$71,02 \pm 1,66$	$6,15 \pm 0,18$
	6 месяцев	Буро- зеленый	Наблюдается легкая опалесценция	Слабый специфический	$2,789 \pm 0,14$	$78,32 \pm 1,17$	$7,03 \pm 0,20$
шалфея лекарственного листья (<i>Salviae officinalis folia</i>)	после приготовления	Темно- зеленый	Прозрачный	Сильный, характерный	$1,331 \pm 0,04$	$75,58 \pm 1,65$	$7,25 \pm 0,16$
	3 месяца	Темно- зеленый	Прозрачный	Сильный, характерный	$1,299 \pm 0,09$	$73,55 \pm 1,02$	$7,90 \pm 0,07$
	6 месяцев	Буро- зеленый	Наблюдается легкая опалесценция	Сильный, характерный	$1,300 \pm 0,40$	$71,27 \pm 1,64$	$8,35 \pm 0,21$
трава клевера лугового (<i>Trifolium pratense L.</i>)	после приготовления	Темно- зеленый	Прозрачный	Слабый специфический запах	$4,620 \pm 0,15$	$75,58 \pm 1,65$	$4,79 \pm 0,19$
	3 месяца	Темно- зеленый	Прозрачный	Слабый специфический запах	$4,610 \pm 0,10$	$73,55 \pm 1,02$	$5,27 \pm 0,09$

Продолжение Таблицы 4

	6 месяцев	Буро-зеленый	Наблюдается легкая опалесценция	Слабый специфический запах	$4,612 \pm 0,12$	$71,27 \pm 1,64$	$5,93 \pm 0,18$
трава козлятника восточного (<i>Galega orientalis</i> Lam.)	после приготовления	Темно-зеленый	Прозрачный	Слабый специфический	$9,431 \pm 0,14$	$80,15 \pm 1,53$	$5,01 \pm 0,11$
	3 месяца	Темно-зеленый	Прозрачный	Слабый специфический	$9,412 \pm 0,22$	$77,23 \pm 1,03$	$6,81 \pm 0,07$
	6 месяцев	Буро-зеленый	Наблюдается легкая опалесценция	Слабый специфический	$9,400 \pm 0,14$	$71,51 \pm 0,99$	$7,18 \pm 0,16$
листья солодки уральской (<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.)	после приготовления	Темно-зеленый	Прозрачный	Слабый специфический	$2,380 \pm 0,12$	$84,54 \pm 1,02$	$2,83 \pm 0,13$
	3 месяца	Темно-зеленый	Прозрачный	Слабый специфический	$2,375 \pm 0,20$	$82,83 \pm 1,82$	$3,19 \pm 0,17$
	6 месяцев	Буро-зеленый	Наблюдается легкая опалесценция	Слабый специфический	$2,354 \pm 0,03$	$79,29 \pm 1,65$	$3,93 \pm 0,12$
плоды люпина многолистного (<i>Lupinus polyphillus</i> Lindl.)	после приготовления	Коричневатый	Прозрачный	Слабый специфический	$8,102 \pm 0,14$	$76,42 \pm 1,55$	$3,23 \pm 0,20$
	3 месяца	Коричневатый	Прозрачный	Слабый специфический	$8,100 \pm 0,15$	$71,54 \pm 1,46$	$4,16 \pm 0,13$

Продолжение Таблицы 4

	6 месяцев	Коричневатый	Прозрачный	Слабый специфический	$7,991 \pm 0,19$	$68,54 \pm 1,28$	$4,89 \pm 0,10$
трава чины луговой (<i>Lathyrus pratensis</i> L.)	после приготовления	Темно-зеленый	Прозрачный	Сильный, характерный	$5,605 \pm 0,22$	$78,68 \pm 1,66$	$5,51 \pm 0,20$
	3 месяца	Темно-зеленый	Прозрачный	Сильный, характерный	$5,581 \pm 0,18$	$73,56 \pm 1,22$	$6,85 \pm 0,19$
	6 месяцев	Буро-зеленый	Наблюдается легкая опалесценция	Сильный, характерный	$5,580 \pm 0,17$	$70,03 \pm 1,02$	$7,00 \pm 0,17$

Определение антиамилазной активности фитостеролов

Результаты количественного определения антиамилазной активности спиртовых извлечений представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Ингибирующая амилазу активность спиртовых извлечений

Сырье	% ингибирования амилазы (1:2000)
шалфея лекарственного листья (<i>Salviae officinalis folia</i>)	34,76 ± 2,54
трава чины луговой (<i>Lathyrus pratensis L</i>)	29,15 ± 4,10
термопсиса ланцетного трава (<i>Thermopsisidis lanceolatae herba</i>)	28,65 ± 4,64
софоры японской бутоны (<i>Sophora japonica L.</i>)	25,13 ± 4,53
сенны листья (<i>Sennae folia</i>)	19,64 ± 3,46
стальника полевого корни (<i>Ononis vernalis radices</i>)	12,92 ± 3,81

Экстракты травы донника, корней и листьев солодки не обладали ярко выраженной способностью ингибировать амилазу в выбранных условиях. При снижении концентрации амилазы в 10 раз все извлечения проявили способность её ингибировать.

Статистическая обработка результатов показала, что коэффициент вариации не превышал 15% и в среднем составил 7%.

Для выявления **компонентов, обладающих антиамилазной активностью**, спиртовые извлечения разделяли методом тонкослойной хроматографии. Для разделения использовали систему растворителей гексан : этилацетат : кислота уксусная ледяная (20:9:1). Далее пластинки с разделенными компонентами спиртовых извлечений пропитывали раствором амилазы (600 мкл в 100 мл раствора) инкубировали во влажной среде при 37°C в течение 45 минут. Затем пластинку пропитывали раствором крахмала и таким же образом инкубировали в течение 20 минут. Далее пластинку промывали 0,1 н раствором йода в воде и оставляли на 5 минут до высыхания и фотографировали.

На пластинках наблюдали появление зон, окрашенных в синий цвет, соответствующих соединениям, способным ингибировать амилазу. На всех хроматограммах наблюдается зона подавления активности амилазы со значение $R_f \approx 0,8$, что совпадает со значением R_f β -ситостерола.

Для **подтверждения антиамилазной активности β -ситостерола** методом ГХ-МС спиртовые извлечения разделяли методом тонкослойной хроматографии в системе растворителей гексан : этилацетат : кислота уксусная ледяная (20:9:1). После просушивания пластинки область с $R_f 0,8$, соответствующую области подавления активности амилазы, а также 1-2 мм выше и ниже этой области соскребали и помещали в пробирку. Биологически

активные вещества экстрагировали 250 мкл дихлорметана, встряхивали в течение 2 минут и центрифугировали при 20000 об/мин в течение 5 минут. Далее проводили анализ методом ГХ-МС. Параллельно выполняли испытание стандартного раствора β -ситостерола (1мг/мл).

На хроматограммах спиртовых извлечений наблюдался пик, по времени удерживания соответствующий пику β -ситостерола на хроматограмме стандартного раствора. Масс-спектр наблюдаемого пика на хроматограммах извлечений соответствовал масс-спектру β -ситостерола из библиотеки спектров так же, как и масс-спектр стандартного раствора. Таким образом, можно предположить, что β -ситостерол ингибирует активность амилазы .

Подтверждение антиамилазной активности β -ситостерола методом спектрофотометрии проводили по той же методике, что и определение антиамилазной активности спиртовых извлечений.

β -ситостерол ингибирует 15,3% амилазы (1:100000). Статистическая обработка метода показала, что коэффициент вариации не превышал 13% и в среднем составил 6%.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведено информационно-аналитическое исследование научных данных о физико-химических свойствах, источниках, фармакологических эффектах и методах анализа и экстракции фитостеролов. Их используют при дислипидемии для снижения уровня холестерина в крови, при доброкачественной гиперплазии предстательной железы. Описаны положительное воздействие фитостеролов при болезни Альцгеймера, при раке различных органов и другие фармакологические эффекты.

Поскольку фитостеролы обладают высокой липофильностью, для их извлечения используют неполярные экстрагенты. Для качественного определения фитостеролов используют методы ТСХ и качественные реакции. Для количественного определения фитостеролов используют как спектральные, так и хроматографические методы, наиболее специфичным и достоверным из которых является метод ГХ-МС.

2. Экспериментально установлены оптимальные условия экстрагирования БАВ из 12 видов ЛРС. Установлено, что нетоксичным и эффективным экстрагентом для извлечения фитостеролов является этанол 95%. В качестве пробоподготовки из лекарственного растительного сырья получены спиртовые извлечения.

Подобраны условия качественного определения фитостеролов в ЛРС методом ТСХ. Оптимальными составами подвижных фаз являются: гексан : этилацетат 3:1 и гексан : этилацетат : уксусная кислота ледяная (20:9:1). Для детектирования фитостеролов целесообразно использовать спиртовой раствор ванилина серноокислого с последующим нагреванием до 100-105°C или 10% раствор серной кислоты в спирте с последующим

нагреванием до 100-105°C и рассматриванием в УФ-свете при длине волны 254 нм. Фитостеролы были обнаружены во всех спиртовых извлечениях из ЛРС.

3. Разработана и валидирована методика количественного определения суммы фитостеролов в пересчете на β -ситостерол в ЛРС методом спектрофотометрии. Пробоподготовка заключается в щелочном гидролизе спиртовых извлечений и дальнейшей экстракции липофильных соединений в гексан. В основе количественного определения лежит реакция фитостеролов с ванилином в среде серной кислоты концентрированной. Максимум поглощения при длине волны около 545 нм.

Проведена валидация методики, предел обнаружения – 0,08 мкг/мл, предел количественного определения 0,24 мкг/мл. Доказаны линейность, прецизионность и правильность методики в диапазоне концентраций 0,2-1,8 мг/мл. Относительная ошибка не превышала 4,1 %. Разработанная методика предусматривает использование доступного оборудования, однако не позволяет идентифицировать индивидуальные фитостеролы и обладает недостаточной специфичностью.

4. Разработана и валидирована методика количественного определения фитостеролов в ЛРС методом ГХ-МС в пересчёте на β -ситостерол. Оптимальным является использование колонки HP-5MS длиной 30 м, диаметром 0,25 мм, неподвижная фаза, содержащая 5% фенил-, 95% метилсилоксана, толщиной 0,25 мкм. Газ носитель – гелий, скорость потока – 0,8 мл/мин.

В качестве стандарта использовали раствор стандарта β -ситостерола (1 мг/мл). Время удерживания β -ситостерола составила 32,237 мин.

Данная методика обладает высокой специфичностью, предел количественного определения – 0,1 нг/мл, доказаны линейность, прецизионность и правильность методики в диапазоне от 0,05 мг/мл до 50,0 мг/мл. Наибольшее суммарное количество фитостеролов в пересчёте на β -ситостерол было обнаружено в лекарственном растительном сырье: трава чины луговой (*Lathyrus pratensis* L.) – 5,605 мг/мл, трава козлятника восточного (*Galega orientalis* Lam.) – 9,431 мг/мл, плоды люпина многолистного (*Lupinus polyphillus* Lindl.) – 8,102 мг/мл.

5. Проведено изучение стабильности фитостеролов в составе спиртовых извлечений из ЛРС в условиях хранения при температуре 20°C в течение 6 месяцев. Помимо этого определяли органолептические свойства спиртовых извлечений, сухой остаток, содержание спирта. Во всех спиртовых извлечениях незначительно уменьшается содержание фитостеролов и наблюдается изменение цвета и опалесценция. Наиболее стабильным является спиртовое извлечение из корней солодки.

6. В ходе исследования антиамилазной активности спиртовых извлечений из ЛРС было установлено, что наибольшая антиамилазная активность наблюдается у экстракта листьев шалфея (*Salviae officinalis folia*), экстракта травы чины луговой (*Lathyrus pratensis* L.), экстракта

травы термопсиса ланцетного (*Thermopsis lanceolatae herba*). Обоснована и доказана антиамилазная активность β -ситостерола.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Практические данные, полученные в ходе диссертационного исследования о количественном содержании фитостеролов в растительном сырье и антиамилазной активности β -ситостерола позволяют расширить сведения о составе фармакопейного и нефармакопейного лекарственного растительного сырья и его возможных фармакологических эффектах. Разработанные методики целесообразно использовать в учебном и научном процессе при преподавании фармакогнозии, а также при разработке критериев контроля качества растительного сырья и фитопрепаратов.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Данные исследования представляют интерес для дальнейшего изучения лекарственных растений, произрастающих на территории Российской Федерации. Разработанные методики позволят проводить количественный и качественный анализ фитостеролов в ЛРС различных семейств, таким образом увеличить сырьевую базу лекарственных растений, богатых БАВ данной группы. Также возможно дальнейшее изучение биологически активных веществ, входящих в состав спиртовых извлечений, обладающих антиамилазной активностью с целью разработки препарата для профилактики диабета.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Филимонова С.М.** Разработка ТСХ методики идентификации фитостеролов в спиртовом экстракте листьев шалфея / С.М. Филимонова, О.Ю. Щепочкина, Е.С.Мельников, Н.П. Садчикова, А. А. Комарова // **Естественные и технические науки.** – 2019. – Т. 137. – № 11. – С. 225–227. [**Chemical Abstracts**]
2. **Филимонова С.М.** Сравнительное изучение методов экстракции и идентификации фитостеролов / С.М. Филимонова, О.Ю. Щепочкина, Ю.В. Медведев, В.И. Прокофьева, А. А. Комарова // **Естественные и технические науки.** – 2019. – Т. 137. – № 11 – С. 219–224. [**Chemical Abstracts**]
3. **Филимонова С.М.,** Щепочкина О.Ю., Кузнецов Р.М., Стреляева А. В. / Разработка и валидация методики количественного определения фитостеролов в экстрактах спиртовых из растительного сырья // Сборник тезисов 75-ой Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки», посвященной 120-летию санитарно-эпидемиологической службы города Ярославля, Ярославль, Россия, 2021. – С. 231-232.
4. **Филимонова С.М.** Применение методов ТСХ и ГХ/МС для оценки качества лекарственного растительного сырья, содержащего фитостеролы. **Биофармацевтический журнал** / О.Ю. Щепочкина, А.В.Стреляева, С.М. Филимонова, Р.М. Кузнецов, Л.О. Мартемьянова // **Биофармацевтический журнал.** – 2021. – Т. 5. – № 13. – С. 38–44. [**Chemical Abstracts**]
5. **Филимонова С.М.,** Щепочкина О. Ю. / Разработка и валидация методики количественного определения липофильных тритерпеноидов в сырье лекарственных растений методом спектрофотометрии // Серия конференций ЗКМУ имени Марата Оспанова, Актобе, Казахстан, 2022. – Т. XVII. – С. 111–113