

ГЛУЩЕНКО СВЕТЛАНА НИКОЛАЕВНА

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ЛИСТЬЕВ И ПОБЕГОВ АЛОЭ ДРЕВОВИДНОГО (*ALOE ARBORESCENS*
MILL.) И АЛОЭ ВЕРА (*ALOE VERA* L. EX WEBB)**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, доцент **Шмыгарева Анна Анатольевна**

Официальные оппоненты:

Белоногова Валентина Дмитриевна, доктор фармацевтических наук, профессор, заведующий кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации;

Зилфикаров Ифрат Назимович, доктор фармацевтических наук, профессор РАН, главный научный сотрудник отдела химии природных соединений Центра химии и фармацевтической технологии Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений».

Ведущая организация:

Пятигорский медико-фармацевтический институт, филиал федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Пятигорск.

Защита состоится «__» _____ 2021 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.061.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке по адресу: 443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171 и на сайте (<http://www.samsmu.ru/scientists/science/referats/2021/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 2021 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук, доцент

Жданова Алина Валитовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Согласно проекту «Стратегия развития фармацевтической промышленности в РФ до 2030 г.» первоочередной задачей считается разработка лекарственных препаратов, а также увеличение доли экспорта лекарственных препаратов отечественного производства. В связи с этим, актуальными являются исследования в области разработки и внедрения лекарственных препаратов (ЛП) на основе лекарственного растительного сырья (ЛРС), преимуществами которых в сравнении с химическими препаратами, являются меньшая токсичность, широкий спектр действия, мягкий терапевтический эффект, а также зачастую более низкая стоимость (Киселева Т.Л., 2010; Куркин В.А., 2015).

Препараты на основе лекарственных растений активно используются для профилактики и лечения заболеваний органов и систем организма. Так, например, при заболеваниях желудочно-кишечного тракта широко используются слабительные препараты на основе ЛРС. Перспективными в данном отношении считаются растения рода Алоэ (Шмыгарева А.А., 2017; Зилфикаров И.Н., 2010). Род Алоэ относится к семейству асфodelовых (*Asphodelaceae*) и насчитывает более 300 видов растений. В России популярным видом является алоэ древовидное (*Aloe arborescens* Mill.), наделенное выносливостью и неприхотливостью к условиям окружающей среды. Алоэ древовидное (*Aloe arborescens* Mill.) в медицинской практике используются в качестве слабительного, регенерирующего, общетонизирующего, адаптогенного и биостимулирующего лекарственного средства (Шмыгарева А.А., 2017; Зилфикаров И.Н., 2008).

В государственном реестре ЛС зарегистрированы следующие препараты алоэ древовидного: «Алоэ экстракт жидкий» (ОАО "ДАЛЬХИМФАРМ", ОАО "Ереванская химико-фармацевтическая фирма", ЗАО "ВИФИТЕХ"); «Алоэ сок» (ЗАО "ВИФИТЕХ"); «Алоэ экстракт сухой» (ООО "Олигофарм"), «Алоэ линимент» (ЗАО "ВИФИТЕХ"); «Алоэ сироп с железом» (ЗАО "ВИФИТЕХ"); «Алором» (ЗАО "ВИФИТЕХ"); «Алоэ-плюс» (ООО "ДОКТОР Н"); «Алоэ ДН» (ООО "ДОКТОР Н"). Несмотря на кажущееся разнообразие препаратов алоэ, в форме суппозитории зарегистрирован только один гомеопатический препарат («Алоэ ДН»).

В странах зарубежья в медицинской практике и в косметологии широко применяется алоэ барбадосское (алоэ истинный, по - латыни — *Aloe barbadensis* Mill., синоним — *Aloe vera* L. Ex Webb), за счет ценного химического состава, а также благодаря регенерирующему, бактериостатическому и слабительному действию. В странах Европы и Америки основными препаратами алоэ вера являются гели и соки (Moniruzzaman M., Rokeya B., Ahmed S., Bhowmik A., Khalil M.I., Gan S.H., 2012). В России алоэ вера используется только в качестве биологически активных добавок (БАД) и косметических средств.

На сегодняшний день проблема стандартизации сырья алоэ древовидного и алоэ вера не решена. В ГФ РФ XIV издания фармакопейные статьи на сырье алоэ древовидного и алоэ вера не представлены.

Важным условием разработки лекарственных препаратов на основе сырья алоэ древовидного и алоэ вера является углубленное изучение химического состава, совершенствование методов стандартизации, в основе которых лежит разработка качественного и количественного анализа ЛРС по ведущей группе биологически активных соединений (Куркин В.А., 2007). Решение вопросов разработки методик стандартизации новых лекарственных растительных препаратов неразрывно связано с разработкой унифицированных методик анализа сырья и препаратов, с использованием стандартных образцов (Самылина И.А. и др., 1994; 2006; Арзамасцев А.П. и др., 2000).

Степень разработанности темы. В ГФ РФ XIV издания фармакопейных статей на сырье представителей рода Алоэ нет. Российскими учеными (Зилфикаров И.Н., Оленников Д.Н., Ибрагимов Т.А., 2010) предложены методики качественного анализа сырья алоэ древовидного методом ТСХ (тонкослойная хроматография) с использованием в качестве подвижной фазы – петролельный эфир-ацетон (7:3) и детекцией в УФ-свете, а также количественного анализа суммы антраценпроизводных сырья алоэ древовидного спектрофотометрическим методом в пересчете на стандартный образец алоэ-эмолина. В Британской, Европейской, Японской и Американской фармакопеях качественный анализ листьев алоэ вера проводят с помощью метода тонкослойной хроматографии, с добавлением метанола и нагреванием до кипения исходного раствора. Хроматографическое разделение проводится в системе растворителей вода-метанол-этилацетат (13:17:100). Помимо метода тонкослойной хроматографии в Японской и Американской фармакопеях используют две цветные реакции. Первая реакция идет с добавлением декагидрататетрабората натрия и воды, путем нагревания на водяной бане, в результате раствор окрашивается в зеленый цвет. Во второй реакции к испытуемому раствору добавляют азотную кислоту, при этом раствор окрашивается в желто-коричневый цвет, который постепенно меняется на зеленый.

В Британской, Японской, Европейской фармакопеях и фармакопее США при количественном анализе используется спектрофотометрический метод, рассчитывается процентное содержание производных гидроксиантрацена, в пересчете на барбалоин.

На сегодняшний день в нашей стране отсутствуют фармакопейные методики качественного и количественного анализа листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера. Предложенные зарубежные фармакопейные методики анализа имеют различные методологические подходы. Исходя из этого, разработка новых подходов к стандартизации ЛРС различных видов рода алоэ является актуальной.

Цель работы и основные задачи исследования. Целью диссертационного исследования является сравнительное фармакогностическое исследование листьев и побегов алоэ древовидного (*Aloe arborescens* Mill.) и алоэ вера (*Aloe vera* L. Ex Webb) в плане совершенствования методов стандартизации сырья и препаратов данных растений.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Систематизировать и обобщить литературные данные по вопросам химического состава, фармакологического действия, применения и стандартизации лекарственного растительного сырья (ЛРС) и лекарственных растительных препаратов (ЛРП) алоэ древовидного и алоэ вера.
2. Провести сравнительное морфолого-анатомическое исследование листьев и побегов алоэ древовидного (*Aloe arborescens* Mill.), алоэ вера (*Aloe vera* L. Ex Webb).
3. Провести сравнительное исследование химического состава листьев и побегов алоэ древовидного (*Aloe arborescens* Mill.) и алоэ вера (*Aloe vera* L. Ex Webb).
4. Разработать методики качественного анализа листьев и побегов алоэ древовидного (*Aloe arborescens* Mill.) и алоэ вера (*Aloe vera* L. Ex Webb).
5. Разработать методики количественного определения суммы антраценпроизводных в листьях и побегах алоэ древовидного (*Aloe arborescens* Mill.) и алоэ вера (*Aloe vera* L. Ex Webb).
6. Разработать показатели качества для сырья алоэ древовидного (*Aloe arborescens* Mill.) и алоэ вера (*Aloe vera* L. Ex Webb).
7. Разработать компонентный состав, обосновать введение сока, а также унифицировать методики стандартизации лекарственных растительных препаратов «Мазь с соком алоэ

древовидного», «Суппозитории с соком алоэ древовидного» с методиками на сырье алоэ древовидное.

8. На основе результатов фармакогностических исследований разработать проект фармакопейной статьи «Алоэ листья и побеги свежие».

Научная новизна. Впервые в сравнительном плане проведено морфолого-анатомическое исследование листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера.

В ходе анализа компонентного состава листьев и побегов алоэ древовидного (*Aloe arborescens* Mill.) и листьев и побегов алоэ вера (*Aloe vera* L. Ex Webb) выделены и распознаны с использованием инструментальных методов (^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопия, спектрофотометрии, масс-спектрометрии), химических превращений индивидуальных веществ, где доминирующими антраценпроизводными являются алоэ-эмодин и барбалоин. Обоснована рациональность осуществления методик стандартизации сырья алоэ древовидного и алоэ вера по ведущей группе БАВ (антраценпроизводным) с применением стандартного образца барбалоина.

Впервые предложенные нами подходы к стандартизации листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера основаны на обнаружении доминирующего антраценпроизводного – барбалоина, осуществляются с использованием тонкослойной хроматографии (ТСХ), спектрофотометрии.

Разработаны и изложены показатели качества, испытания, методики стандартизации антраценпроизводных в разработанных нами препаратах «Мазь с соком алоэ древовидного», «Суппозитории с соком алоэ древовидного».

Научная новизна диссертационного эксперимента обоснована патентом РФ на изобретение № 2730845 «Способ получения суппозиторий с соком алоэ древовидного» (Бюл. № 24 от 26.08.20).

Теоретическая и практическая значимость работы. Исследованы морфолого-анатомические особенности листьев и побегов алоэ древовидного, алоэ вера в сравнительном плане и выявлены диагностически значимые признаки, являющиеся общими для представителей рода *Asphodelaceae*. Выявлены новые ранее не описанные признаки, селективно отличающие листья и побеги сравниваемых видов алоэ.

Разработаны методики стандартизации антраценпроизводных в листьях и побегах алоэ древовидного и алоэ вера с применением тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии. Предложенный нами качественный анализ методом ТСХ предусматривает использование в качестве стандартного образца (СО) раствор барбалоина. Метод дифференциальной спектрофотометрии суммы антраценпроизводных в пересчете на барбалоин предлагается для количественного анализа.

Разработаны показатели качества листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера, в том числе числовые (содержания суммы антраценпроизводных в пересчете на барбалоин не менее 2%). В результате проведенных экспериментов разработан проект фармакопейной статьи «Алоэ листья и побеги свежие».

Разработан компонентный состав, обосновано использование сока, а также унифицированы методики стандартизации лекарственных растительных препаратов «Мазь с соком алоэ древовидного», «Суппозитории с соком алоэ древовидного» с методиками на сырье алоэ древовидное.

Для препаратов алоэ древовидного установлено противомикробное действие в отношении следующих микроорганизмов: *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*.

Методология и методы исследования. В основу методологии диссертации заложен анализ и обобщение литературных данных в области фармакогностического изучения растений рода Алоэ, степень актуальности и темы диссертационной работы. В соответствии с намеченной целью и задачами был обозначен план работы над диссертацией, а также выбраны объекты и методы исследования.

В качестве объектов диссертационной работы использовали листья и побеги алоэ древовидного, алоэ вера культивируемые на кафедре управления экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии Оренбургского государственного медицинского университета, культивируемые в Оренбургской области, сок алоэ, водно-спиртовые экстракты и разработанные нами ЛРП, на основе сырья алоэ древовидного. Экспериментальную часть диссертационной работы осуществляли с помощью колоночной хроматографии, цифровой и люминесцентной микроскопии, тонкослойной хроматографии, масс-спектрометрии, спектрофотометрии, ЯМР-спектроскопии, пробирочных и гистохимических реакций, микробиологических методов. Статистический анализ данных проводили с использованием программного обеспечения согласно ГФ РФ XIV издания.

Связь задач исследования с планами научных работ. Диссертационная работа выполнялась согласно тематическому плану научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России (115042810034 до 14.05.2019, наименование НИОКР - «Комплексные исследования по разработке лекарственных средств природного и синтетического происхождения»; с 14.05.2019 номер государственной регистрации темы АААА-А19-119051490148-7, наименование НИОКР – «Химико-фармацевтические, биотехнологические, фармакологические и организационно-экономические исследования по разработке, анализу и применению фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов»).

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Результаты сравнительного морфолого-анатомического исследования листьев и побегов алоэ древовидного, алоэ вера.
2. Результаты изучения компонентного состава листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера.
3. Результаты экспериментальной части по разработке методик качественного и количественного анализа листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера.
4. Данные по разработке показателей качества листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера.
5. Данные по разработке компонентного состава, обоснованию использования сока, а также по унификации методик стандартизации лекарственных растительных препаратов «Мазь с соком алоэ древовидного», «Суппозитории с соком алоэ древовидного» с методиками на сырье алоэ древовидное.

Степень достоверности. Экспериментальными данными доказана достоверность диссертационных исследований, которые установлены с использованием колоночной хроматографии, цифровой и люминесцентной микроскопии, тонкослойной хроматографии, спектрофотометрии, масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии, химических и микробиологических методов анализа, что доказано большим числом схем, рисунков, таблиц и хроматограмм. Статистическую обработку данных диссертационного исследования осуществляли с использованием программы «Microsoft Excel» согласно требованиями ГФ РФ XIV издания. Отличиями между группами признаются статистически существенными при $P < 0,05$. Методики количественного определения, предлагаемые нами, валидированы.

Апробация работы. Итоговые результаты диссертационных исследований изложены и оценены на областных, российских и международных конференциях: международная научно-практическая конференция «Современные технологии в мировом научном пространстве» (г. Казань, 2016 г.); I Межвузовская студенческая научно-практическая конференция «Современные проблемы фармакогнозии» (г. Самара, 2016 г.); X Всероссийская студенческая научная конференция с международным участием «Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты» (г. Самара, 2016 г.); международная научно-практическая конференция «Проблемы и перспективы развития науки в России и мире» (г. Екатеринбург, 2017 г.); Международный молодежный научно-практический форум «Медицина будущего: от разработки до внедрения» (г. Оренбург, 2017 г.); Международная научно-практическая конференция «Прорывные научные исследования как двигатель науки» (г. Тюмень, 2018 г.); X Международный симпозиум «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (г. Москва, 2018 г.); Международная научно-практическая конференция «Перспективные этапы развития научных исследований: теория и практика» (г. Кемерово, 2018 г.); III Межвузовская студенческая научно-практическая конференция «Современные проблемы фармакогнозии» (г. Самара, 2018 г.).

Публикации. На основе результатов диссертационного исследования опубликовано в 17 научных работах, из них 5 статей в журналах, рекомендуемых ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, и 1 статья в изданиях, индексируемых в международных наукометрических базах (Scopus), получен патент РФ на изобретение № 2730845 «Способ получения суппозиториев с соком алоэ древовидного» (Бюл. № 24 от 26.08.20).

Внедрение в практику. Фрагменты результатов диссертационного исследований используются в научном и учебном процессе в ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России: на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, кафедре фармацевтической технологии, кафедре управления и экономики фармации, кафедре химии фармацевтического факультета, в ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России на кафедре управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии фармацевтического факультета, в производственном процессе на ЗАО «Самаралектравы», в рабочем процессе ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», ГАУЗ «Оренбургский информационно-методический центр по экспертизе, учету и анализу обращения средств медицинского применения».

Личный вклад автора. Автором подобраны объекты исследования, направление, определены цель и задачи. Автором проведен научно-информационный поиск информации и экспериментальная часть. Автору принадлежит ведущая роль в сборе, анализе, систематизации и обобщении полученных результатов.

Объем и структура диссертации. Общий объем диссертационной работы – 167 страниц машинописного текста, включает 29 таблиц, 51 рисунок. Структура диссертационной работы следующая: введение, обзор литературы, описание объектов и методов исследования, четыре главы, раскрывающие результаты экспериментальных исследований, их обсуждение, общие выводы, приложение и список литературы, состоящий из 133 источников, из которых 33 на иностранных языках.

Во введении обоснована актуальность темы, приведены цель и задачи диссертационной работы, раскрыта новизна и практическая значимость экспериментальных исследований, обозначены положения, выносимые на защиту. Глава 1 посвящена литературному обзору данных о современном состоянии исследований листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ

вера, в которой структурирована и резюмирована информация о химическом составе изучаемых растений, фармакологическому действию, а также применению в медицинской и фармацевтической практике. В главе 2 описаны объекты и методы исследования, методики химического, физико-химического изучения лекарственного сырья и индивидуальных веществ. В главе 3 в сравнительном плане представлены результаты морфолого-анатомического исследования листьев и побегов изучаемых видов. В главе 4 приведены результаты сравнительного химического исследования листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера. В главе 5 отражены результаты исследований по разработке методик стандартизации сырья алоэ древовидного и алоэ вера. Глава 6 посвящена обоснованию состава, методик получения и стандартизации новых лекарственных растительных препаратов «Мазь с соком алоэ древовидного», «Суппозитории с соком алоэ древовидного».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектами данной диссертационной работы являлись свежие образцы листьев и побегов алоэ древовидного, алоэ вера, культивированные на кафедре управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии Оренбургского государственного медицинского университета (с 2015 по 2019 гг.).

В рамках диссертационной работы исследовались лекарственные растительные препараты: жидкий экстракт алоэ древовидного в ампулах – производитель ЗАО «Вифитех», Россия; сок алоэ древовидного – производитель ЗАО «Вифитех», Россия; линимент алоэ древовидного – производитель ЗАО «Вифитех», Россия; разработанные нами ЛРП – мазь с соком алоэ древовидного и суппозитории с соком алоэ древовидного; индивидуальные вещества: барбалоин, алоэ-эмодин и алоэнин.

Анатомо-гистологическое исследование осуществляли с использованием цифровых микроскопов марки «Motic DM-111» и «Motic DM-39C-N9GO-A», люминесцентного микроскопа Альтами-ЛЮМ-2 с увеличениями $\times 40$, $\times 100$, $\times 400$. Изучение химического состава листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера проводили методом адсорбционной жидкостной колоночной хроматографии с использованием сефадекса LH-20, полиамида SC 6, силикагеля L 40/100 и L 100/160. Для исследования извлечений из изучаемого сырья, выделенных веществ и разработанных лекарственных растительных препаратов методом тонкослойной хроматографии использовали пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» и «Сорбфил ПТСХП-А-УФ» (Россия). Спектрофотометрическое исследование извлечений из сырья и разработанных препаратов проводили на спектрофотометрах «Specord 40» (AnalytikJena), «СФ-2000», «UNICO 2800» в кюветах с толщиной слоя 10 мм в диапазоне длин волн от 190 нм до 700 нм. ^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР-спектры регистрировали на приборе «Bruker AM 300» (300 МГц). Масс-спектры электронного удара регистрировали на приборе «Kratos MS-30».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Сравнительное морфолого-анатомическое исследование листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера

Основные морфологические признаки листа алоэ древовидного: сочные, голые, мясистые, мечевидные, зеленовато-сизого цвета, в ширину до 7 см, в длину до 50 см, в толщину до 3 см, восковой налет, зубчатый край, стеблеобъемлющее влагалище, выпуклый с внутренней и вогнутый с наружной стороны. У алоэ древовидного маловетвистый и очень короткий стебель

с огромным количеством рубцов, который в длину достигает до 60 см (в комнатной культуре), но иногда в условиях естественного произрастания он достигает до 1 м, в толщину – до 12 мм (рис. 1).

Листья алоэ вера сочные, гладкие, темно-зеленого цвета с короткими зубцами по краям. Листья достигают 40 см в длину, в ширину – до 10 см, в высоту - до 1 м. Листья алоэ вера формируют прикорневую розетку диаметром 80 см. У алоэ вера очень короткий, но достаточно толстый ствол с малоразвитой корневой системой. На таком одревесневшем стволе остаются «рубцы» – это следы опавших старых листьев (рис 1.)



А



Б

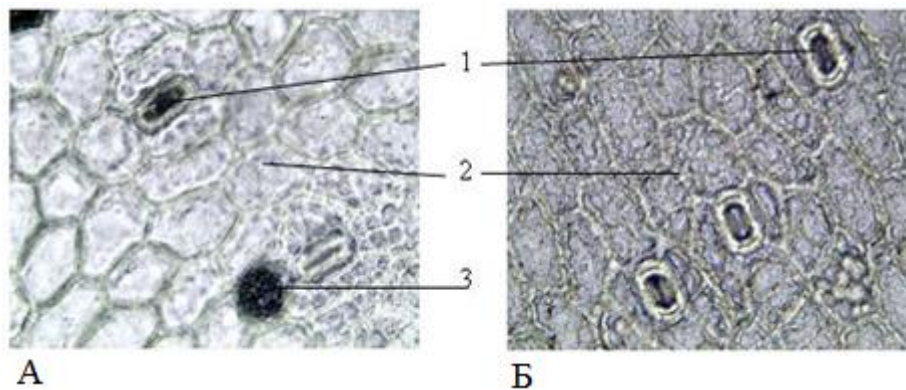
Рисунок 1 – Образцы сырья алоэ.

Обозначения: А – алоэ древовидное (*Aloe arborescens* Mill.);

Б – алоэ вера (*Aloe vera* L. Ex Webb).

При рассмотрении листа алоэ древовидного с поверхности видны клетки верхнего эпидермиса с мало извилистыми или почти прямыми стенками, нижнего - извилистые. Клетки верхнего и нижнего эпидермиса имеют комбинированную форму. Поверхность листа покрыта восковым слоем. Эпидерма однослойная, устьица с 4 околоустьичными клетками (тетрацитный тип), причем они погружены в ткань листа. На верхнем эпидермисе диагностируются секреторные клетки (рис. 2).

В качестве значимых анатомо-морфологических признаков листьев алоэ вера можно выделить клетки мякоти листа: округлые, крупные, бесцветные. Игольчатые кристаллы оксалата кальция располагаются по одному или несколько кристаллов вместе или собранные в пучок (рис. 3). Эпидерма однослойная, устьица с 4 околоустьичными клетками (тетрацитный тип). Эпидермис подстилается слоем мезофилла, который содержат рафиды.



А

Б

Рисунок 2– Препарат листа с поверхности алоэ древовидного (x400).

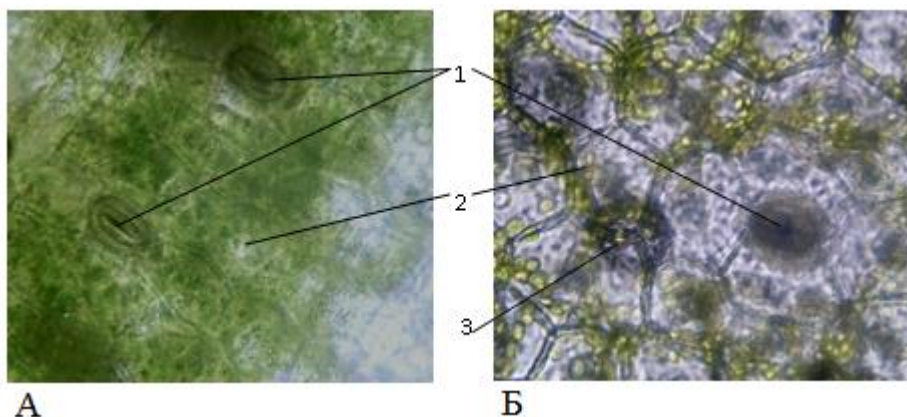
Поперечный срез: А – верхний эпидермис; Б – нижний эпидермис.

Обозначения:

1 – устьице;

2 – хлоренхима;

3 – секреторная клетка.



**Рисунок 3 – Препарат
листа с поверхности
алоэ вера (x400).
Поперечный срез: А –
верхний эпидермис;
Б – нижний эпидермис.**

Обозначения:

1 – устьице;

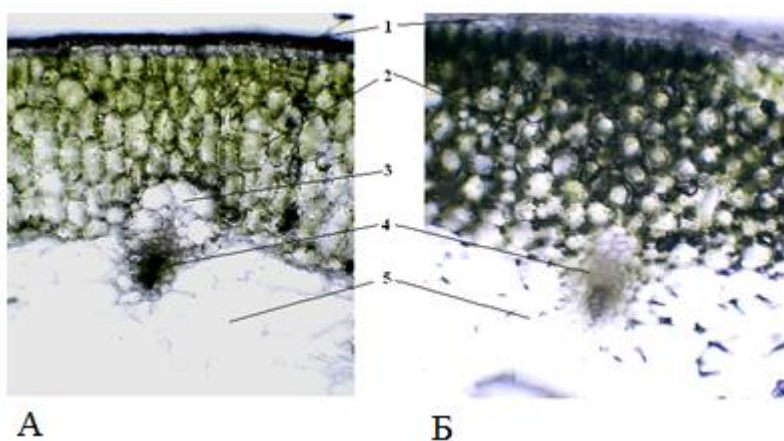
2 – хлоренхима;

3 – секреторная клетка.

У алоэ древовидного наружная стенка эпидермальных клеток очень толстая, кутинизированная (рис. 4). Эпидерма подстиается слоем хлоренхимы, у алоэ древовидного состоящих из продолговатых клеток. В паренхиме данных видов растений содержится большое количество рафидов. Внутренняя часть листа состоит из очень крупной паренхимы, содержащей клеточный сок. На границе хлоренхимы с паренхимой располагаются в 1 ряд, на расстоянии друг от друга коллатеральные закрытые проводящие пучки с флоэмой, обращенной к эпидермису (рис.4). К флоэме снаружи примыкают крупные клетки с коричневатым, мелкозернистым содержимым – так называемые алоиновые клетки – хорошо диагностируемые у алоэ древовидного (рис. 4).

Внутренняя часть листа алоэ вера содержит гигантские клетки трубчатой формы с млечным соком. Он желтоватого оттенка и имеет очень горький вкус.

На границе хлоренхимы с паренхимой располагаются в 1 ряд, на расстоянии друг от друга коллатеральные закрытые проводящие пучки с флоэмой, обращенной к эпидермису. К флоэме снаружи примыкают крупные клетки с коричневатым содержимым – так называемые алоиновые клетки, длинной трубчатой формы, в которых локализуются фенольные вещества (рис. 4).



**Рисунок 4 – Поперечный срез
листа алоэ древовидного (А) и
алоэ вера (Б).**

Обозначения:

1 – эпидермис;

2 – палисадная ткань;

3 - «алоиновые» клетки;

4 – закрытый проводящий пучок;

5 – паренхима.

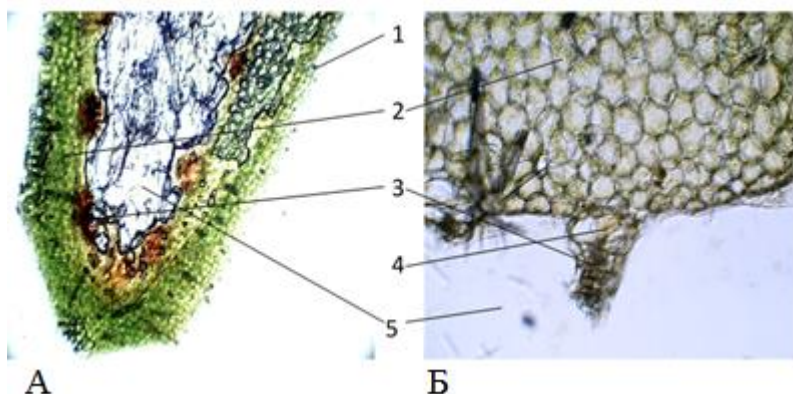


Рисунок 5– Поперечный срез листа алоэ вера (x400).

Обозначения:

1 – эпидермис;

2 –хлоренхима;

3-закрытый проводящий пучок;

4- «алоиновые» клетки; 5 – паренхима.

Особенности люминесценции клеточных стенок флоэмы проводящих пучков отличают сравниваемые виды алоэ друг от друга. В частности, при облучении УФ-светом с длиной волны $\lambda=360$ нм клеточные стенки флоэмы у листьев алоэ древовидного не светятся, в то время как в аналогичных условиях освещения у алоэ вера клеточные стенки флоэмных клеток проводящего пучка люминесцируют бурым цветом. Данная особенность может быть обусловлена видовой специфичностью и использована в анализе подлинности сырья алоэ вера (рис. 6 и 7).

Гистологически эпидермис листа алоэ вера аналогичен эпидермису алоэ древовидного. Однако заметна значительная разница в размерах хлоропластов клеток мезофилла. У алоэ вера они имеют овальную форму (рис. 8) и значительный размер, превышающий размеры хлоропластов в клетках мезофилла алоэ древовидного (рис. 9).

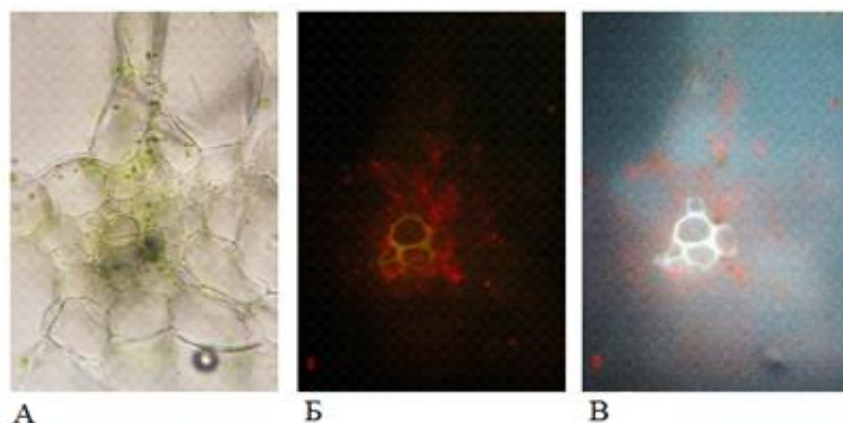


Рисунок 6 – Проводящие элементы пучка алоэ древовидного – поперечное сечение (x 400).

Обозначения:

A – видимый свет;

Б – облучение светом с $\lambda= 420$ нм;

В - облучение светом с $\lambda= 360$ нм.

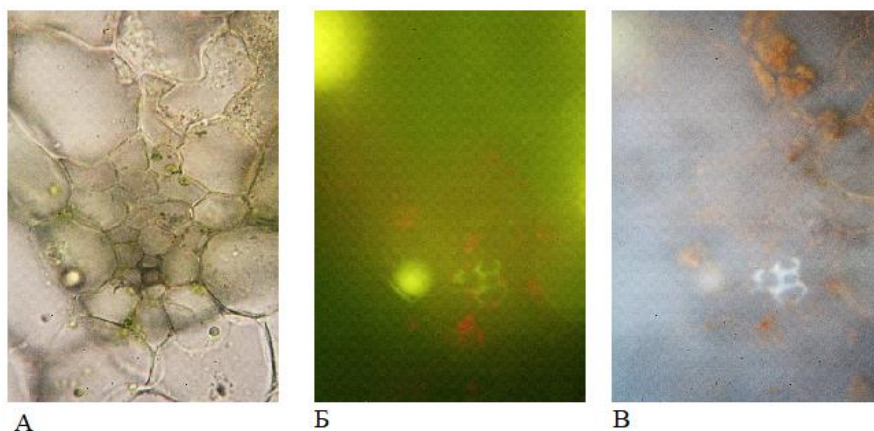


Рисунок 7 –Проводящие элементы пучка листа алоэ вера – поперечное сечение (x 100).

Обозначения:

A – видимый свет;

Б – облучение светом с $\lambda= 420$ нм;

В - облучение светом с $\lambda= 360$ нм.

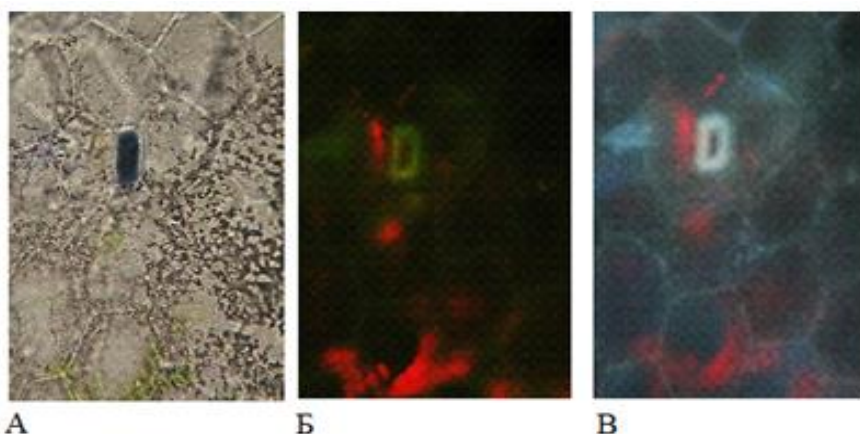


Рисунок 8 – Эпидермис листа алоэ древовидного – вид с поверхности (х400).

Обозначения:

А – видимый свет;

Б – облучение светом с $\lambda = 420$ нм;

В – облучение светом с $\lambda = 360$ нм.

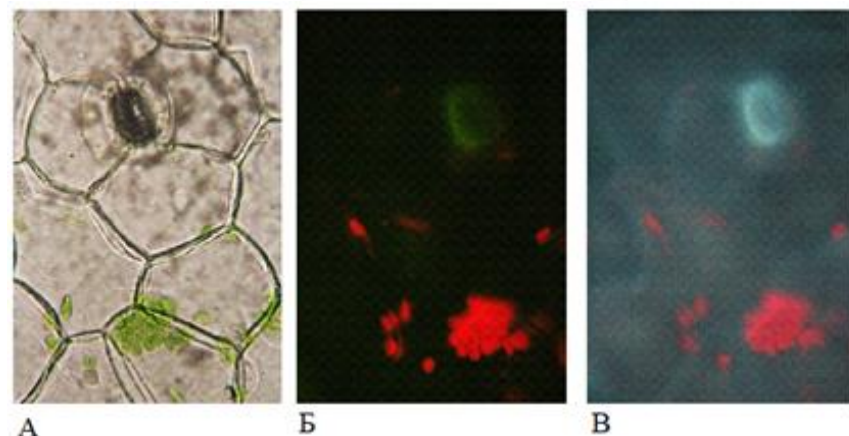


Рисунок 9 – Эпидермис листа алоэ вера – вид с поверхности (х400).

Обозначения:

А – видимый свет;

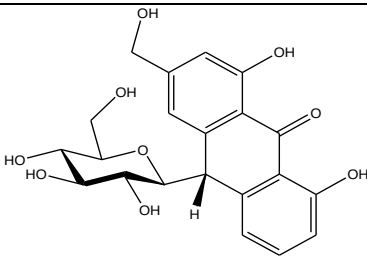
Б – облучение светом с $\lambda = 420$ нм;

В – облучение светом с $\lambda = 360$ нм.

2. Фитохимическое исследование алоэ древовидного и алоэ вера

Из листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера методом адсорбционной колоночной хроматографией, с последующей кристаллизацией и перекристаллизацией выделены 3 индивидуальных соединения: барбалоин, известный как смесь изомеров алоина А (1) и алоина В (2), алоэнин (3) и алоэ-эмодин (4) (табл. 1), для которых с использованием ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, спектрофотометрии и масс-спектрометрии установлена структура (рис. 10-12).

Таблица 1 – Характеристики веществ, выделенных из экстракта листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера

№ п/п	Название соединения	Химическая формула	Характеристики
1	Алоин А		Кристаллы желтого цвета

2	Алоин В		Кристаллы желтого цвета
3	Алоэнин		Светло-желтые игольчатые кристаллы
4	Эмодин		Игольчатые кристаллы оранжевого цвета

Известно, что барбалоин представляет собой смесь двух стереоизомеров – алоина А и алоина В, молекулярная масса которых подтверждается данными масс-спектрометрии: m/z 441.1908 $[M+Na]^+$.

В спектре ЯМР 1H присутствуют однопротонные синглетные сигналы при 12.46 м.д. и 12.58 м.д., характерные для ОН-групп при С-1 и С-8 молекулы антраценпроизводных. В спектре ЯМР 1H обнаружены также сигналы ароматических протонов при 7.22 м.д. (1H, д, $J = 2.0$, H-2), 7.32 (1H, т, $J = 7.5$, H-6), 7.69 (1H, д, $J = 2.0$, H-4), 7.80 (1H, дд, $J = 1.5$ и 8.0, H-7), 8.43 (1H), 7.87 (1H, дд, $J = 1.5$ и 8.0, H-5), подтверждающих наличие заместителей в молекуле барбалоина (1 и 2) в положениях С-1, С-3 и С-8.

Природа заместителя (CH_2OH -группа) в положении С-3 подтверждается наличием в спектре ЯМР 1H двухпротонного дублетного сигнала при 4.57 м.д. с константой спин-спинового взаимодействия (КССВ) 7.5 Гц.

Кроме того, в спектре ЯМР 1H антраценпроизводных 1 и 2 обнаружен при 4.63 м.д. однопротонный дублетный сигнал протона при С-10 с КССВ 7 Гц. Этот вывод подтверждается тем обстоятельством в спектр ЯМР ^{13}C присутствует лишь один сигнал при 193.35, принадлежащий карбонильной группе при С-9. Наличие в молекуле антраценпроизводных 1 и 2 β -D-глюкопиранозы подтверждается данными 1H -ЯМР-спектроскопии: однопротонный дублетный сигнал аномерного протона (H-1') при 4.78 м.д. с КССВ 7.2 Гц. О присоединении глюкозы в положение С-10 с образованием С-С-связи свидетельствуют величины химических сдвигов в 1H -ЯМР-спектре протона при С-10 (4.78 м.д.) и углеродного атома С-10 в ^{13}C -ЯМР-спектре при 52.08 м.д.

В спектре ЯМР 1H соединения 4 присутствуют сигналы ароматических протонов при 5.58 м.д. (1H, $J = 2$, H-3), 6.24 м.д. (1H, $J = 2$, H-5), 6.35 м.д. (1H, $J = 2$, H-5) и 6.48 м.д. (1H, $J = 2$, H-5'). В спектре ЯМР 1H соединения 4 обнаружены трехпротонные синглетные сигналы при 2.12 м.д. и 3.83 м.д., принадлежащие соответственно ароматической CH_3 -группе при С-2' и

ОСН₃-группе - при С-4 (рис. 10). Данные выводы подтверждаются также результатами ¹³С ЯМР-спектроскопии: сигналы при 19.80 м.д. (С-2', СН₃) и 56.25 м.д. (С-4, СН₃О) (рис. 11).

О наличии в молекуле соединения 4 свободной фенольной группы свидетельствует однопротонный синглетный сигнал в спектре ЯМР ¹Н при 10.87 м.д. Наличие в спектре ЯМР ¹³С соединения 4 сигнала при 171.01 м.д. подтверждает тот факт, что в молекуле данного вещества присутствует карбонильная группа.

Наличие в молекуле соединения 4 β-D-глюкопиранозы подтверждается данными ¹Н-ЯМР-спектроскопии: однопротонный дублетный сигнал аномерного протона (Н-1'') при 4.82 м.д. с КССВ 7.0 Гц. О присоединении глюкозы в положение (С-6'), свидетельствует величина химического сдвига в ¹³С-ЯМР-спектре углеродного атома 6': 164.09 м.д.

Таким образом, соединение 4 имеет строение 4-метокси-6-(2'-β-D-глюкопиранозил-4'-гидрокси-6'-метилфенил)-2-пирона и идентифицировано как алоэзин. Строение алоэзина (4) подтверждается также данными масс-спектрометрии: *m/z* 411.1285 [M+H]⁺, *m/z* 433.1106 [M+Na]⁺, *m/z* 449.0855 [M+K]⁺ (рис. 12).

Соединение (4) идентифицировано нами как 1,6,8-тригидрокси-3-метилантрахинон (эмодин) на основании физико-химических констант, а также данных УФ-, ¹Н-ЯМР-, ¹³С-ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии (*m/z*: M+ 270).

Таким образом, доминирующими компонентами побегов и листьев алоэ древовидного и алоэ вера являются антраценпроизводные барбалоин (1 и 2) и эмодин (4), а также алоэзин (3). Соединения 1-4 впервые выделены из свежих побегов и листьев алоэ вера в Российской Федерации.

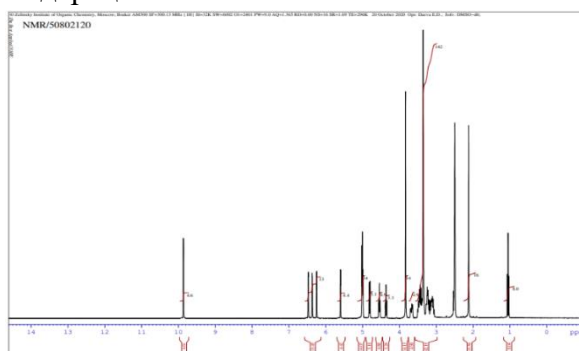


Рисунок 10 – ¹Н-ЯМР-спектр алоэзина в DMSO-d₆.

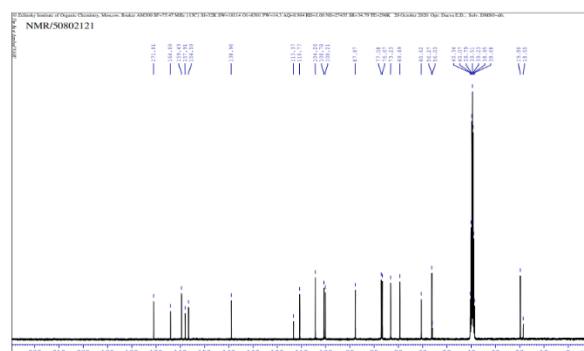


Рисунок 11 – ¹³С-ЯМР-спектр алоэзина в DMSO-d₆.

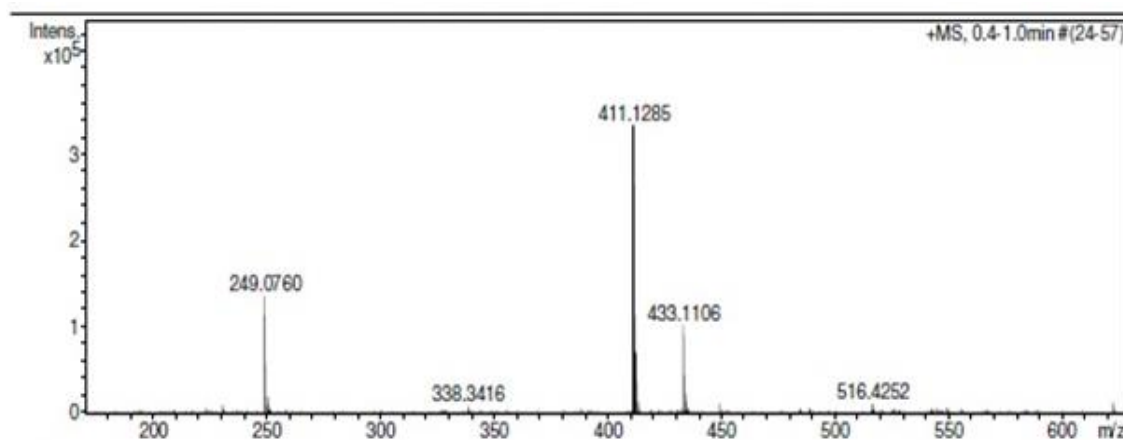


Рисунок 12– Масс-спектр алоэзина.

3. Разработка методик качественного и количественного анализа листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера

Для определения подлинности листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера разработаны методики тонкослойной хроматографии (ТСХ) и спектрофотометрии. В рамках данной диссертационной работы в ходе фитохимического исследования листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера было обнаружено доминирующее антраценпроизводное – барбалоин. Следовательно, на данное вещество целесообразно опираться при разработке методик качественного и количественного анализа листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера.

3.1. Качественный анализ методом тонкослойной хроматографии

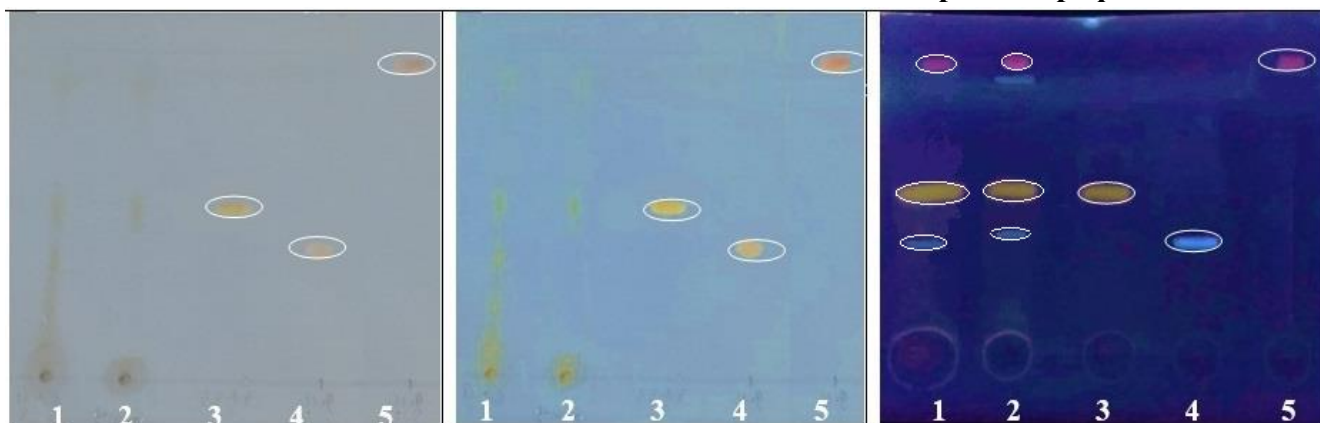


Рисунок 13 – Хроматографический профиль водно-спиртового извлечения из листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера: А – идентификация в дневном свете;

Б – идентификация в УФ-свете при 254 нм;

В – идентификация в УФ-свете при 365 нм.

Обозначения: 1 – водно-спиртовое извлечение из листьев и побегов алоэ древовидного;

2 – водно-спиртовое извлечение из листьев и побегов алоэ вера;

3 – барбалоин; 4 – алоэнин; 5 – алоэ-эмодин.

В результате исследований проанализирован ряд систем (хлороформ – спирт этиловый 96% – вода (26:16:3); этилацетат – муравьиная кислота – вода (10:2:3); этилацетат – этанол – вода (100:13,5:10)) и выявлена оптимальная по соотношению и составу для максимально четкого разделения БАВ из сырья алоэ древовидного и алоэ вера система, а именно: хлороформ – спирт этиловый 95% – вода (26:16:1,5). Детекцию исследуемых хроматографических пластинок проводили при дневном свете и под УФ излучением при 365 и 254 нм.

При сравнительном анализе хроматографических профилей водно-спиртовых экстрактов из сырья алоэ древовидного и алоэ вера под УФ излучением при 365 нм барбалоин зафиксирован в форме пятна с лимонно-желтой флуоресценцией при $R_f \approx 0,52$, пятно алоэнина при $R_f \approx 0,45$ с голубой флуоресценцией, пятно алоэ-эмодина при $R_f \approx 0,9$ с темно-оранжевой флуоресценцией (рис. 13).

Проведенные фитохимические исследования сырья алоэ древовидного и алоэ вера позволили выявить диагностически значимые соединения, при этом размер и интенсивность свечения пятна барбалоина из водно-спиртовых экстрактов сырья анализируемых растений дает возможность предположить его высокое содержание в сырье.

3.2. Качественный анализ методом спектрофотометрии

Дополнительно для определения подлинности сырья рекомендовано проведение спектрофотометрического анализа. Во время анализа изучались спектры щелочно-аммиачных растворов водно-спиртовых извлечений из сырья алоэ древовидного и алоэ вера. О вкладе антраценпроизводных в спектр лекарственного растительного сырья алоэ древовидного и алоэ вера свидетельствует bathochromный сдвиг длинноволновой полосы при прямой спектрофотометрии и дифференциальные спектры с максимумом поглощения 412-416 нм. При этом важно отметить, что в случае алоэина не зафиксирован bathochromный сдвиг кривой поглощения в щелочно-аммиачной среде, что свидетельствует о возможности определения суммы антраценпроизводных в присутствии данного вещества, несмотря на его относительно высокое содержание. Исследование прямых и дифференциальных спектров водно-спиртовых и щелочно-аммиачных растворов листьев алоэ древовидного и алоэ вера показало, что максимум поглощения находится в длинноволновой области дифференциального спектра при длине волны 412 ± 2 нм, что характерно для барбалоина, в то время как при прямой спектрофотометрии наблюдается лишь плечо. Пик при длине волны 412 ± 2 нм свидетельствует о наличии барбалоина в составе сравниваемых видов растений (рис. 14).

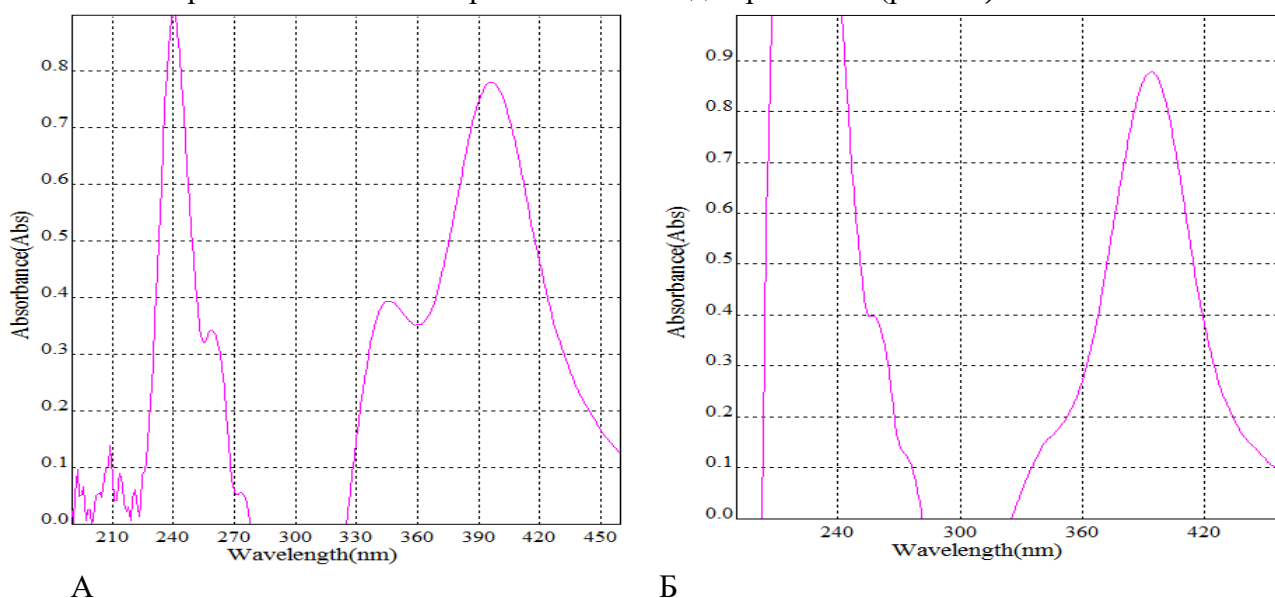


Рисунок 14 - Дифференциальные спектры растворов водно-спиртовых и щелочно-аммиачных извлечений из листьев алоэ древовидного (А) и алоэ вера (Б)

3.3. Разработка методик количественного определения суммы антраценпроизводных в листьях и побегах алоэ древовидного и алоэ вера

Определено, что выделенный из листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера барбалоин во многом определяет характер кривой поглощения водно-спиртового извлечения, а значит, является диагностически значимым веществом для данного вида лекарственного растительного сырья.

С учетом того, что антраценпроизводные и, в частности, барбалоин, оказывают существенное воздействие на электронный спектр и, принимая во внимание тот факт, что максимум поглощения водно-спиртового извлечения сырья алоэ древовидного и алоэ вера, и раствора барбалоина (смесь алоина А и алоина В) аналогичны, и зафиксированы в условиях дифференциальной спектрофотометрии при 412 нм, в связи с этим целесообразно определение содержания суммы антраценпроизводных в пересчете на барбалоин при 412 нм.

На начальном этапе разработки методики количественного определения экстракция из анализируемых видов сырья проводилась с различными концентрациями экстрагента, в различных соотношениях «сырье-экстрагент», а также с вариацией времени экстрагирования на водяной бане. На основании проведенных экспериментов зафиксированы условия, при которых антраценпроизводные экстрагируются в максимальных количествах из сырья алоэ древовидного и алоэ вера: экстрагент – 60% C₂H₅ОН; соотношение «сырье – экстрагент» – 10:50; время экстракции – 30 мин на водяной бане при температуре 80–90°C.

Измерение оптической плотности проводят при длине волны 412 нм через 40 минут после приготовления всех растворов.

Методика количественного определения сырья: 10,0 г свежесобранного и измельченного сырья алоэ древовидного (алоэ вера) отвешивают в термоустойчивую колбу с притертым шлифом на 100 мл, прибавляют 60% C₂H₅ОН 50 мл. Колбу, закупоренную пробкой, взвешивают на аналитических весах. Далее колбу с присоединенным дефлегматором (h = 50 см) 30 мин подвергают воздействию температуры с использованием водяной бани при умеренном кипении. Колбу с содержимым остужают, прикрывают пробкой, взвешивают и дополняют массу до исходной 60% C₂H₅ОН. Извлечение отфильтровывают через бумажный фильтр (раствор А).

Испытуемый раствор: 2 мл (раствор А) отмеривают в колбу объемом 25 мл со шлифом из стекла, устойчивого к повышенным температурам, добавляют до 25 мл щ-а раствором. Оптическую плотность испытуемого раствора фиксируют после 40 минут при помощи спектрофотометра при $\lambda=412$ нм.

Раствор сравнения: 2 мл раствора А отмеряют в колбу объемом на 25 мл из стекла, устойчивого к повышенным температурам, доводят до метки 60% этиловым спиртом. Оптическую плотность испытуемого раствора фиксируют после 40 минут при помощи спектрофотометра при $\lambda=412$ нм.

Примечание: Приготовление раствора барбалоина. 0,0050 г барбалоина отвешивают в колбу объемом на 25 мл со шлифом из термоустойчивого стекла, доливают 60% C₂H₅ОН до 25 мл (раствор А). 5 мл (раствор А) отмеривают в колбу на 25 мл со шлифом из стекла, устойчивого к повышенным температурам, добавляют щелочно-аммиачный раствор до 25 мл (раствор Б). Определяют значение оптической плотности раствора Б при $\lambda=412$ нм с использованием спектрофотометра.

Раствор сравнения: 5 мл (раствор А) отмеряли в колбу объемом на 25 мл из стекла, устойчивого к повышенным температурам, добавляли до метки 60% этиловым спиртом.

Содержание суммы антраценпроизводных в пересчете на барбалоин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{E \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 5 \cdot 100 \cdot 100}{E_0 \cdot m \cdot 25 \cdot 2 \cdot 25 \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

E₀ – оптическая плотность раствора РСО барбалоина; m – масса навески сока, г; m₀ – масса РСО барбалоина, г; W – влажность, в процентах.

При отсутствии стандартного образца барбалоина целесообразно использовать теоретическое значение удельного показателя поглощения – 102:

$$X = \frac{E \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{m \cdot 102 \cdot 2 \cdot (100 - W)}, \text{ где}$$

E – оптическая плотность; m – масса сырья, в г; W – влажность, в процентах.

102 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) щелочно-аммиачного раствора РСО барбалоина А при 412 нм.

Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы антраценпроизводных в листьях алоэ древовидного и алоэ вера представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2 – Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы антраценпроизводных в листьях и побегах алоэ древовидного

f	$\bar{X}$	S	$P, \%$	$t(P,f)$	ΔX	$E, \%$
10	2,46	0,227	95	2,23	$\pm 0,18$	$\pm 6,40$

Таблица 3 – Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы антраценпроизводных в листьях и побегах алоэ вера

f	$\bar{X}$	S	$P, \%$	$t(P,f)$	ΔX	$E, \%$
10	2,29	0,198	95	2,23	$\pm 0,14$	$\pm 6,30$

Таким образом, в результате проведенных исследований нами предложена методика количественного определения суммы антраценпроизводных спектрофотометрическим методом (дифференциальный вариант) для сырья алоэ древовидного и алоэ вера в пересчете на барбалоин без предварительной стадии кислотного гидролиза и окисления антрагликозидов.

Содержание суммы антраценпроизводных в сырье алоэ древовидного находится в пределах от 2,3 до 2,6%, а в алоэ вера от 2,1 до 2,4%. Опираясь на полученные данные содержания антраценпроизводных в сырье алоэ древовидного и алоэ вера, в качестве нижней границы целесообразней предложить концентрацию не менее 2%.

3.7. Числовые показатели для листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера.

Для листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера были рассчитаны числовые показатели цельного сырья. В результате проведенных исследований мы можем рекомендовать нижний предел содержания антраценпроизводных в сырье алоэ древовидного и алоэ вера 2%, потеря массы при высушивании $\leq 10\%$, влажность $\geq 92\%$, не допускается наличие органических примесей, общая зола $\leq 2\%$, поломанных листьев $\leq 10\%$, минеральные примеси $\leq 0,5\%$. Числовые показатели, полученные в результате эксперимента, использовались при оформлении проекта фармакопейных статей «Алоэ листья и побеги свежие».

4. Разработка и стандартизация лекарственных препаратов на основе сырья алоэ древовидного

4.1. Состав, методика получения и стандартизации новых лекарственных растительных препаратов на основе сырья алоэ древовидного

Первоначально при разработке состава для дерматологической мази и суппозиторий нами проводились исследования по обоснованию введения в состав сгущенного сока алоэ древовидного. Для сравнительного анализа мы использовали сок алоэ древовидного, сгущенный сок алоэ древовидного (с содержанием влаги не более 30%), спиртовой экстракт алоэ древовидного 1:10, густой экстракт алоэ древовидного (с содержанием влаги не более 25%) (табл. 4).

Таблица 4 – Результаты количественного содержания суммы антраценпроизводных в различных извлечениях из сырья алоэ древовидного

№	Виды извлечений из сырья алоэ древовидного	Содержание суммы антраценпроизводных в пересчете на барбалоин, %
1.	Сок алоэ древовидного	6,68±0,02
2.	Сгущенный сок алоэ древовидного	7,33±0,04
3.	Спиртовой экстракт алоэ древовидного 1:10	6,81±0,03
4.	Густой экстракт алоэ древовидного	6,97±0,03

Количественное содержание в сгущенном соке алоэ древовидного по сравнению с остальными извлечениями из сырья алоэ древовидного максимально, соответственно на основании данных результатов именно его вводили в мазь и суппозитории.

При разработке дерматологической мази осуществляли подбор оптимальной основы, способствующей формированию максимально положительному терапевтическому эффекту мази. Для приготовления мазей использовали следующие основы, разрешенные к медицинскому применению: липофильные, гидрофильные и комбинированные. В качестве гидрофильной основы использовали: крахмал, воду и глицерин (мазевая основа № 3). Состав липофильно-гидрофильной основы (консистентная эмульсия вода-вазелин): вазелин, эмульгатор Т2 и вода (мазевая основа № 2), а компоненты комбинированной – безводный ланолин, вазелин, масло какао (мазевая основа № 4); парафин, вазелин, безводный ланолин, твин-80 и вода (мазевая основа № 1).

Все анализируемые дерматологические мази содержали 10% сгущенного сока алоэ древовидного, который вводили с учетом физико-химических свойств и характера основообразующих компонентов.

При выборе мазевой основы для разрабатываемой нами дерматологической мази учитывались результаты анализа степени высвобождения действующих веществ и определения антимикробной активности, при этом наилучшие результаты зафиксированы у мазевой основы №2, которую, на основании вышеизложенного, мы утвердили в качестве основы.

Препарат готовили по следующей методике: 10,8 г вазелина с 1,8 г эмульгатора Т-2 сплавляли в фарфоровой чашке на водяной бане. Полученный сплав переносили в ступку и добавляли 5,4 г горячей воды очищенной. Затем добавляли 2,0 г сгущенного сока алоэ древовидного, тщательно перемешивали пестиком. Масса мази около 20 г. Анализ суммыантраценпроизводных в пересчете на барбалоин проводили методом спектрофотометрии.

Методика количественного определения: В колбу из термоустойчивого стекла на 25 мл отвешивают 2 грамма мази, прибавляют 25мл 60% C₂H₅ОН, нагревают до расплавления основы на водяной бане и перемешивают на протяжении 3 минут. Далее остужают и отфильтровывают в мерную колбу на 25 мл (раствор А). Р-а А (2 мл), отмеривают в колбу на 25 мл и добавляют щелочно-аммиачный раствор до метки.

Раствор сравнения: р-р А (2 мл) отмеривают в колбу на 25 мл и добавляют Н₂О очищенную до 25 мл. При длине волны 412 нм измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре.

Расчет содержания барбалоина в мази проводят по формуле:

$$X = \frac{E \times 25 \times 25 \times P \times 1000}{E_{1\text{см}}^{1\%} \times m \times 2 \times 50}, \text{ где}$$

E - оптическая плотность исследуемого раствора; $E_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения рабочего стандартного образца барбалоина при длине волны 412 нм; m – масса навески, г; P - масса мазевой массы, г.

Содержание антраценпроизводных в полученном препарате составило 6,9 мг.

Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы антраценпроизводных в мази с соком алоэ древовидного представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Метрологические характеристики метода количественного определения антраценпроизводных в мази из сгущенного сока алоэ древовидного

f	$\bar{X}$	S	$P, \%$	$t(P, f)$	ΔX	$E, \%$
10	6,9	0,03405	95	2,25	$\pm 0,07595$	$\pm 5,90$

В качестве основного действующего компонента, вводимого в состав суппозиториев, использовали сгущенный сок алоэ древовидного, выбранный на основании результатов исследований, описанных в таблице 4.

Далее для получения суппозиториев с соком алоэ древовидного подбирали основу, обеспечивающую максимальный терапевтический эффект:

- суппозитории с соком алоэ древовидного на липофильной основе №1 (состав основы: эмульгатор твин-80 и масло какао).

- суппозитории с соком алоэ древовидного на гидрофильной основе №2 (состав основы: желатин, вода и глицерин).

При выборе суппозиторной основы для разрабатываемых нами суппозиторий учитывались результаты испытаний, в соответствии с ОФС «Суппозитории», а именно: распадаемость, температура плавления, степень высвобождения действующих веществ, что позволили считать гидрофильную основу № 2 (желатин, вода и глицерин) оптимальной основой для суппозиторий с соком алоэ древовидного.

Для приготовления 5 суппозиториев с соком алоэ древовидного на гидрофильной основе №2 (состав основы: желатин, вода и глицерин) желатин медицинский в количестве 3 г помещают в фарфоровый стакан, заливают водой и дают набухнуть 30-45 мин, затем добавляют глицерин в количестве 15 г и помещают на водяную баню, перемешивая до однородной массы. Потом добавляют 2 г сгущенного сока алоэ древовидного и охлаждают массу до температуры, близкой к температуре застывания.

Приготовленную массу заливают в разъемные суппозиторные пластмассовые формы, предварительно смазанные вазелиновым маслом. Получают 5 суппозиториев состава:

- 0,3 г – сгущенного сока алоэ древовидного;
- 2,7 г – желатино-глицериновой суппозиторной основы.

Анализ суммы антраценпроизводных в пересчете на барбалоин проводили методом спектрофотометрии.

Методика количественного определения: в фарфоровой посуде на водяной бане расплавляют 5 г суппозиториев, охлаждают. В колбу из термостойкого стекла на 50 мл отвешивают 2 г полученной массы, прибавляют 25 мл 60% C_2H_5OH из мерного цилиндра, нагревают на водяной бане продолжительностью 15 мин, смешивают в течение 3 мин, остужают и фильтруют в колбу на 25 мл (раствор А). Р-а А (2 мл), отмеривают в колбу на 25 мл добавляют щелочно-аммиачным раствором до метки.

Раствор сравнения: р-р А (2 мл) отмеривают в колбу на 25 мл и добавляют H_2O очищенную до 25 мл. Оптическую плотность раствора измеряют при 412 нм на спектофотометре.

Расчет содержания суммы антраценпроизводных в пересчете на барбалоин в суппозиториях проводят по формуле:

$$X = \frac{E \times 25 \times 25 \times P \times 1000}{E_{1\text{см}}^{1\%} \times m \times 2 \times 50}, \text{ где}$$

Е – оптическая плотность; $E_{1\text{см}}^{1\%}$ – удельный показатель поглощения РСО барбалоина (102); Р – масса суппозитория (3 грамма); m – масса точной навески (2 грамма).

Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы антраценпроизводных в суппозиториях с сгущенным соком алоэ древовидного приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Метрологические характеристики методики количественного определения суммы антраценпроизводных в суппозиториях со сгущенным соком алоэ древовидного

f	$\bar{X}$	S	$P, \%$	$t(P, f)$	ΔX	$E, \%$
10	7,20	0,0447	95	2,25	$\pm 0,0997$	$\pm 6,80$

4.2. Стандартизация лекарственных препаратов на основе сырья алоэ древовидного

Нами были исследованы следующие образцы ЛП на основе алоэ древовидного, представленные на фармацевтическом рынке РФ:

- Жидкий экстракт алоэ в ампулах (ЗАО «Вифитех»), Россия, состав – листья алоэ древовидного 360 мг;
- Сок алоэ (ЗАО «Вифитех»), Россия, состав – 80 мл сока из листьев алоэ древовидного;
- Линимент алоэ (ЗАО «Вифитех»), Россия, состав – 7,8 г сока из листьев алоэ.

Содержание суммы антраценпроизводных в пересчете на барбалоин в различных препаратах представлено в таблице 7.

Таблица 7 – Результаты количественного содержания суммы антраценпроизводных в пересчете на барбалоин в различных препаратах на основе алоэ древовидного

№	Лекарственный растительный препарат	Содержание суммы антраценпроизводных в пересчете на барбалоин, %
1	Жидкий экстракт алоэ в ампулах (ЗАО «Вифитех»), Россия	5,4
2	Сок алоэ (ЗАО «Вифитех»), Россия	4,4
3	Линимент алоэ (ЗАО «Вифитех»), Россия	5,6

Метрологические характеристики методики количественного определения содержания суммы антраценпроизводных в промышленных препаратах алоэ древовидного представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Метрологические характеристики методики количественного определения суммы антраценпроизводных в промышленных препаратах алоэ древовидного и алоэ вера

Препараты	f	$\bar{X}$	S	$P, \%$	$t(P, f)$	ΔX	$E, \%$
Жидкий экстракт алоэ древовидного в ампулах	10	5,40	0,01	95	2,25	$\pm 0,0223$	$\pm 5,90$
Линимент алоэ	10	5,60	0,0144	95	2,25	$\pm 0,0323$	$\pm 6,10$
Сок алоэ древовидного	10	4,40	0,01702	95	2,25	$\pm 0,0379$	$\pm 6,20$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное сравнительное фармакогностическое исследование листьев и побегов алоэ древовидного (*Aloe arborescens* Mill.) и алоэ вера (*Aloe vera* L. Ex Webb) дало возможность сформулировать следующие общие выводы:

1. Проведенное сравнительное морфолого-анатомическое исследование листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера, что позволило выявить основные отличительные признаки изучаемых видов алоэ, которые заключаются в различной форме алоиновых клеток у алоэ древовидного и алоэ вера, различной форме и размерах клеток эпидермиса сравниваемых объектов, наличие пучков рафид на нижнем эпидермисе алоэ вера, наличие секреторных клеток на верхнем эпидермисе алоэ древовидного и алоэ вера.

2. В результате проведенной люминесцентной микроскопии было выявлено общее анатомическое строение: толстая кутикула у листьев рода алоэ; равная степень развития ксилемы и флоэмы; наличие в клетках водоносной ткани кристаллов оксалата кальция.

3. Проведенный фитохимический анализ листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера с использованием метода ТСХ позволил обнаружить следующие соединения: барбалоин, алоэ-эмодин и алоэнин. Зафиксирован одинаковый максимум кривой поглощения водно-спиртового извлечения из листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера при 412 ± 2 нм с помощью дифференциальной спектрофотометрии.

4. Из листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера с использованием колоночной хроматографии, реакций кислотного и ферментативного гидролиза, ТСХ, УФ-спектроскопии, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии выделены и идентифицированы индивидуальные вещества – барбалоин, алоэ-эмодин и алоэнин, причем установлено, что барбалоин является доминирующим компонентом сырья данных растений.

5. Разработана методика качественной оценки листьев алоэ древовидного и алоэ вера методом тонкослойной хроматографии с использованием стандартного образца барбалоина. Кроме того, оценка подлинности листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера возможна при использовании спектроскопии: кривые поглощений водно-спиртового извлечения из листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера имеют максимум при длине волны 412 ± 2 нм.

6. Разработана методика количественного определения суммы антраценпроизводных в пересчете на барбалоин и абсолютно сухое сырье в листьях и побегах алоэ древовидного методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 412 нм без предварительного гидролиза и окисления. Содержание суммы антраценпроизводных в пересчете на барбалоин и абсолютно сухое сырье в листьях и побегах алоэ древовидного варьирует от 2,3 до 2,6%.

7. Разработана методика количественного определения суммы антраценпроизводных в пересчете на барбалоин и абсолютно сухое сырье в листьях и побегах алоэ вера методом дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 412 нм. Содержание суммы антраценпроизводных в пересчете на барбалоин и абсолютно сухое сырье в листьях и побегах алоэ вера варьирует от 2,1-2,4%.

8. Разработаны методики количественного определения суммы антраценпроизводных в пересчете на барбалоин и абсолютно сухое сырье методом дифференциальной спектрофотометрии в разработанных нами препаратах из сока листьев алоэ древовидного в мази и суппозиториях.

9. При проведении исследований препаратов на основе сока алоэ древовидного согласно ОФС «Мази» и «Суппозитории» было обосновано применение данных лекарственных растительных препаратов в качестве противомикробных и ранозаживляющих средств.

10. Основные положения разработанных нами методик качественного, количественного анализа, а также числовые показатели для листьев и побегов алоэ древовидного и алоэ вера нашли отражение в проекте ФС на ЛРС – «Алоэ листья и побеги свежие».

Практические рекомендации

Результаты диссертационной работы позволяют усовершенствовать подходы к стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего антраценпроизводные, и могут быть использованы в учебном процессе по курсам «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия», а также в центрах сертификации и контроля качества лекарственных средств и на фармацевтических предприятиях.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Проведение диссертационного исследования имеет научно-практическое значение для фармакогнозии и фармацевтической химии в том числе с целью дальнейшего изучения химического состава растений, содержащих антраценпроизводные, а также разработки объективных методик анализа и подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Витвинина, С.Н. Морфолого-анатомическое исследование листьев и побегов алоэ древовидного / С.Н. Витвинина, В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, А.Н. Саньков // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук**. – Т. 17 (№ 5-3). – 2015. – С.947-950.
2. Куркин, В.А. Сравнительное морфолого-анатомическое исследование алоэ древовидного и алоэ пестрого / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, А.Н. Саньков, С.Н. Витвинина // **Медицинский альманах**. – №2 (42). – 2016. – С.147-149.
3. Глущенко, С.Н. Морфолого-анатомическое исследование листа алоэ-вера / С.Н. Глущенко, А.А. Шмыгарева, А.Н. Саньков // **Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация**. – №3. – 2018. – С.205-210.
4. Глущенко, С.Н. Разработка методики количественного определения антраценпроизводных в листьях алоэ древовидного (*Aloe arborescens* L.) / С.Н. Глущенко, В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, А.Н. Саньков // **Вестник Смоленской государственной медицинской академии**. – Т.19 (№3). – 2020. – С.214-219.
5. Глущенко, С.Н. Разработка суппозиторий на основе сока алоэ древовидного / С.Н. Глущенко, А.А. Шмыгарева, А.Н. Саньков // **Аспирантский Вестник Поволжья**. - № 1-2. – 2020. – С.126-130.
6. Glushchenko, S.N. Development of dermatological ointment based on Aloe arborescens juice / S.N. Glushchenko, E. A. Mikhaylova, V.A. Kurkin, A. A. Kochukova // **Research Journal of Pharmacy and Technology (RJPT)**. – 2021. – №14. – P. 3617 – 3620.
7. Витвинина, С.Н. Обзор рынка слабительных препаратов РФ / С.Н. Витвинина // Сборник материалов X Всероссийской студенческой научной конференции с международным участием. – Самара: СаМГМУ, 2016. – С. 84-85.
8. Глущенко, С.Н. Алоэ в трудах великого врачевателя Авиценны (Абу али ибн синны) / С.Н. Глущенко, А.А. Шмыгарева // Перспективные этапы развития научных исследований: теория и практика. Сборник статей Международной научно - практической конференции. – Кемерово: ЗапСибНЦ, 2018. – С. 108-109.
9. Глущенко, С.Н. Анализ растительных лекарственных препаратов на основе алоэ-вера, представленных на рынке США / С.Н. Глущенко, А.А. Шмыгарева // Прорывные научные исследования как двигатель науки. Сборник статей Международной научно - практической конференции – Тюмень: НИЦ АЭТЕРНА, 2018. – С. 227-231.
10. Глущенко, С.Н. Проведение качественного анализа листьев алоэ древовидного и листьев алоэ пестрого / С.Н. Глущенко // Сборник материалов международного молодежного научно-

- практического форума «Медицина будущего: от разработки до внедрения». – Оренбург: Изд-во ОрГМУ, 2017. – С.94-95.
11. Глущенко, С.Н. Сравнительное исследование методик стандартизации сырья алоэ в фармакопеях зарубежных стран и фармакопеи России / С.Н. Глущенко // Современные проблемы фармакогнозии. Сборник материалов III Межвузовской студенческой научно-практической конференции. – Самара: СамГМУ, 2018. – С. 68-72.
 12. Глущенко, С.Н. Сравнительный анализ номенклатуры группы растительных лекарственных средств, на основе алоэ древовидного, представленных на российском рынке / С.Н. Глущенко, А.А. Шмыгарева // Современные технологии в мировом научном пространстве. Сборник статей Международной научно - практической конференции. – Казань: НИЦ АЭТЕРНА, 2016. – С.166-170.
 13. Глущенко, С.Н. Сравнительный качественный анализ листьев алоэ древовидного (*Aloe arborescens* L.) и листьев алоэ вера (*Aloe vera* L.) / С.Н. Глущенко, А.А. Шмыгарева, В.А. Куркин // Фенольные соединения: свойства, активность, инновации. Сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты». – Москва, 2018. – С. 255-259.
 14. Глущенко, С.Н. Сравнительный качественный анализ листьев алоэ древовидного (*Aloe arborescens* L.) и листьев алоэ пестрого (*Aloe variegata* L.) / С.Н. Глущенко, А.А. Шмыгарева // Современные проблемы фармакогнозии. Сборник материалов I Межвузовской студенческой научно-практической конференции. – Самара: СамГМУ, 2016. – С. 78-83.
 15. Шмыгарева, А.А. Актуальные аспекты создания импортозамещающих слабительных лекарственных препаратов / А.А. Шмыгарева, К.Н. Семенюта, М.В. Рыбалко, С.Н. Глущенко // IX Международная научно-практическая конференция «Проблемы и перспективы развития науки в России и мире». – Екатеринбург, 2017. – С. 135-139.
 16. Глущенко, С.Н. Разработка методик стандартизации лекарственных растительных препаратов на основе алоэ древовидного и алоэ вера / С.Н. Глущенко, А.А. Шмыгарева // Современные проблемы фармакогнозии. Сборник материалов IV Межвузовской студенческой научно-практической конференции. – Самара: СамГМУ, 2019. – С. 119-125.
 17. Куркин, В.А. Новые подходы к количественному определению антраценпроизводных в сырье и препаратах алоэ древовидного / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, А.А. Шмыгарева, С.Н. Глущенко //OlymPus. Гуманитарная версия. – №1 (12). – 2021. – С.107-109.

Патент

Пат. 2730845 Российская Федерация, МПК А61К 36/886 А61К 9/02. Способ получения суппозиторий с соком алоэ древовидного/ Куркин В. А., Глущенко С.Н., Шмыгарева А.А., Саньков А.Н.; заявитель и патентообладатель СамГМУ. – № 2020104649; заявл. 31.01.2020; опубл. 26.08.2020, Бюл. № 24. – 8 с.: ил.