

*На правах рукописи*

**РЯБОВ НИКОЛАЙ АНАТОЛЬЕВИЧ**

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ  
ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО (*QUERCUS ROBUR L.*)**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Самара – 2022

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

**Научный руководитель:**

кандидат фармацевтических наук, доцент **Рыжов Виталий Михайлович**

**Официальные оппоненты:**

**Белоногова Валентина Дмитриевна** – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии, заведующий кафедрой;

**Клен Елена Эдмундовна** – доктор фармацевтических наук, доцент; федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтической химии с курсами аналитической и токсикологической химии, заведующий кафедрой

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Курский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Курск.

Защита состоится «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 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/2022/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2022 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,**  
кандидат фармацевтических наук, доцент

**Жданова Алина Валитовна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** В структуре приоритетных направлений современной отечественной фармации значимыми являются задачи, связанные с расширением перечня качественных, эффективных и безопасных лекарственных средств (ЛС), а также с замещением импортных лекарственных препаратов (ЛП) отечественными аналогами, в том числе препаратами на основе лекарственного растительного сырья (ЛРС). Данные направления согласуются с Приказом МЗ РФ от 13.02.2013 г. № 66 «Об утверждении Стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года», а также Постановлением Правительства РФ № 305 от 15.04.2014 «Об утверждении государственной программы Российской Федерации “Развитие фармацевтической и медицинской промышленности”» (с изменениями на 31 марта 2021 года), проектом распоряжения Правительства РФ «Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года» («Фарма-2030»).

На настоящее время использование фитопрепаратов в целях лечения и профилактики заболеваний приобретает все большее значение. Это обусловлено тем, что комплекс биологически активных веществ (БАВ) в препаратах растительного происхождения имеет биологическое родство с организмом человека, а также обладает большим терапевтическим диапазоном и хорошей переносимостью, что является важной предпосылкой для изучения растительных объектов (Самылина И.А. и др., 2020; Куркин В.А., 2019; Пупыкина К.А., Кудашкина Н.В., 2009; Киселева Т.Л., 2010; Бубенчикова В.Н. и др. 2013). Ценными свойствами лекарственных растительных препаратов (ЛРП) также является широта терапевтического действия, минимальные побочные эффекты при гармоничном сочетании со многими препаратами, что особо важно при профилактике и длительном лечении хронических заболеваний (Куркин В.А., 2019; Самылина И.А., Куркин В.А. и др. 2016).

Наряду с огромным перечнем отечественных лекарственных растительных объектов перспективным является дуб черешчатый (*Quercus robur* L.) семейства Буковые (*Fagaceae*). Дуб черешчатый широко распространён в Западной Европе и европейской части России, является одной из основных лесообразующих пород широколиственных лесов Европы. На территории РФ, в том числе и в Самарской области, помимо дуба черешчатого, успешно культивируются и другие виды рода *Quercus*: дуб скальный - *Quercus petraea* Liebl.; дуб красный - *Quercus rubra* L.; дуб летний фастигиата - *Quercus robur* var. *fastigiata* (Lam.) Spach.; дуб монгольский - *Quercus mongolica* Fisch. ex Ledeb.; дуб крупноплодный - *Quercus macrocarpa* Michaux и дуб Мюлленберга - *Quercus Muehlenbergii* Engelmann.

Дуб черешчатый входит в Государственную фармакопею Российской Федерации (ГФ РФ) и в фармакопею ряда зарубежных стран. Кора дуба черешчатого обладает ценными фармакологическими свойствами, такими как противовоспалительное и вяжущее действие. Фармакологические свойства данного растения связаны с особенностями химического состава, который представлен широким спектром БАВ, в частности, веществами фенольной природы, такими как дубильные вещества (не менее 7 %), флавоноиды (в листьях до 0,6 %, в побегах – до 1,2 %) – кверцетин, кверцитрин, 3-глюкозид и 3-рамнозид кемпферола, 3-глюкозид изорамнетины, рутин, кемпферол (Буданцев, А.Л. 2006, Basile et al., 2000), а также стерины – ситостерин (Буданцев А.Л., 2006, Wrzwciono U., 1963).

Помимо коры дуба черешчатого представляют интерес такие морфологические органы данного растения, как листья, почки, многолетняя стволовая кора, которые не являются

фармакопейными видами сырья. Отсутствие нормативной документации для сырья листьев и почек дуба черешчатого не позволяет использовать их в официальной медицине. Анализ научной литературы показал перспективность создания ЛРП на основе сырья дуба черешчатого, в особенности препаратов с антимикробным действием (Scalbert A., 1991; Cowan M.M., 1999; Andrenšek et al., 2004).

Направление диссертационной работы ориентировано на поиск новых перспективных БАВ, изучение вопросов диагностики и стандартизации сырья с использованием морфолого-анатомических, физико-химических и фармакологических методов в целях комплексного использования фитомассы дуба черешчатого – листьев, почек и многолетней коры.

Таким образом, углубленное фармакогностическое изучение ЛРС дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) является актуальной задачей, решение которой позволит расширить спектр применяемых видов ЛРС дуба черешчатого в отечественной фармации.

**Степень разработанности темы.** В ГФ РФ XIV издания включена ФС на кору дуба черешчатого (обыкновенного). Кора дуба черешчатого также включена в ряд зарубежных фармакопей: Европейскую, Британскую, Немецкую, Французскую. Однако во всех представленных фармакопеях отсутствует информация о других видах рода *Quercus*, таких как дуб скальный, дуб красный, дуб летний фастигиата, дуб монгольский, дуб крупноплодный, дуб Мюлленберга.

Изучение морфолого-анатомического строения листьев и побегов дуба черешчатого ранее проводилось учеными БрГУ им. А.С. Пушкина, тем не менее, отсутствуют данные люминесцентного анализа листьев и почек дуба черешчатого (Кругворучко А., 2017; Шевчук Д.И. и др., 2019 г.).

Исследование новых БАВ в ЛРС дуба черешчатого, в основном, сконцентрировано на коре. Так, авторами Тульского государственного университета проводилось исследование химического состава веществ гексанового, толуольного, ацетонового, этанольного и хлороформного экстрактов коры дуба черешчатого хромато-масс-спектрометрическим методом анализа. Полученные в ходе исследования данные наиболее полно отображают имеющийся на сегодня профиль БАВ, содержащихся в коре дуба черешчатого (Платонов В.В. и др., 2020 г.).

Усовершенствование методик стандартизации ЛРС дуба черешчатого является актуальной задачей, что подтверждается работами отечественных и зарубежных ученых (Scalbert A., 1987 г.; Абдулина С.Г. и др., 2010 г.; Евдокимова О.В., 2012 г.; Рябинина Е.И., 2012 г.; Сорокина А.А., 2014 г.; Калинин А.М., 2016 г.). В соответствии с ГФ РФ XIV издания (ФС.2.5.3.0071.18) определение содержащихся в коре дубильных веществ предлагается проводить в соответствии с требованиями ОФС.1.5.3.0008.18 «Определение содержания дубильных веществ в ЛРС и ЛРП». Однако кора дуба черешчатого содержит широкий перечень БАВ флавоноидов, что не всегда используется на этапах стандартизации данного сырья. Нерешенным остается вопрос изучения химического состава листьев и почек дуба черешчатого, а также разработка методик стандартизации содержащихся в них БАВ.

В плане изучения фармакологических свойств листьев дуба имеется ряд исследований, подтверждающих перспективность создания лекарственных препаратов на их основе. Получены данные о наличии антиоксидантной, антимикробной, антигипоизомеразной и антипролиферативной активности для листьев некоторых видов рода *Quercus*: *Q. resinosa*, *Q. laeta*, *Q. grisea* и *Q. sobtusata*, среди которых вид *Q. resinosa* представляет наибольшую ценность ввиду наличия выраженной антимикробной активности (Sánchez-Burgos J. A., 2013). Листья дуба черешчатого *Quercus robur* L. также могут обладать антимикробной активностью, поэтому представляется актуальным изучение данного вопроса.

Таким образом, листья, почки и кора дуба черешчатого являются перспективными видами сырья для фармацевтической и медицинской практики, в связи с чем возникает необходимость в углубленном их изучении: проведение фитохимического и морфолого-анатомического анализа в целях стандартизации новых видов ЛРС и дальнейшего их включения в ГФ РФ для возможности дальнейшего создания ЛРП на их основе.

Все вышеизложенное доказывает, что исследования в области изучения химического состава и стандартизации новых видов ЛРС дуба черешчатого являются актуальными.

**Цель работы и задачи исследования.** Целью данной работы является изучение перспективности использования фитомассы дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) в плане научного обоснования введения в фармацевтическую практику новых видов лекарственного растительного сырья.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

1. Проведение морфолого-анатомического исследования листьев и почек дуба черешчатого (*Quercus robur* L.).
2. Проведение фитохимического исследования БАВ листьев дуба черешчатого.
3. Разработка методик качественного анализа листьев и почек дуба черешчатого, а также экстракционного препарата «Дуба черешчатого листьев настойка» с использованием методов тонкослойной хроматографии, УФ-спектроскопии и высокоэффективной жидкостной хроматографии.
4. Разработка методик количественного определения суммы флавоноидов в листьях и почках дуба черешчатого.
5. Предварительное сравнительное исследование антимикробной активности водно-спиртовых извлечений и экстракционных препаратов на основе листьев, почек и коры дуба черешчатого.
6. Предварительное изучение диуретической активности БАВ листьев дуба черешчатого и острой токсичности экстракционного препарата «Дуба черешчатого листьев настойка».
7. Изучение и разработка нормируемых показателей качества листьев дуба черешчатого в целях создания проекта фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Дуба черешчатого листа» для включения в ГФ РФ.

**Научная новизна.** В ходе проведения диссертационного исследования было впервые проведено сравнительное морфолого-анатомическое исследование листьев и почек дуба черешчатого *Quercus robur* L. с использованием метода люминесцентного анализа.

Впервые из листьев дуба черешчатого выделены 3-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона и моносахарид рамноза. Впервые в РФ из листьев дуба черешчатого выделен астрагалин (3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид кемпферола), который определен как диагностически значимое вещество для листьев дуба черешчатого и некоторых представителей рода *Quercus* (отмечено его наличие во всех исследуемых видах, кроме дуба красного), а также флавоноиды афзелин (3-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидроксифлавона), кверцитрин (3-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона), изокверцитрин (3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона), и 3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона, химическая структура которых установлена с применением методов тонкослойной хроматографии (ТСХ), УФ-спектрофотометрии,  $^1\text{H}$ -ЯМР-,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии, а также масс-спектрометрии.

Впервые разработаны научно аргументированы методики качественного анализа БАВ в листьях, почках и коре многолетней дуба черешчатого, а также экстракционного препарата «Дуба черешчатого листьев настойка» методом тонкослойной хроматографии, дифференциальной УФ-спектрофотометрии. Для экстракционного препарата «Дуба черешчатого листьев настойка» предложен также способ качественного анализа методом ВЭЖХ.

Впервые разработаны и научно обоснованы методики количественного анализа суммы флавоноидов в листьях и почках дуба черешчатого. Содержание суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого варьирует от 0,30 % до 1,63 % при использовании метода дифференциальной спектрофотометрии при аналитической длине волны 412 нм в пересчете на стандартный образец (СО) рутина. Значение этого показателя для почек дуба черешчатого варьирует от 0,27 % до 0,44 % в пересчете на СО цинарозида (аналитическая длина волны 400 нм). По итогам проведенной работы был оформлен патент РФ «Количественное определение суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого» и получена справка на приоритет изобретения РФ «Способ количественного определения суммы флавоноидов в почках дуба черешчатого».

Впервые было проведено исследование водно-спиртовых извлечений и спиртовых экстракционных препаратов на основе листьев, коры (фармакопейной и многолетней) и почек дуба черешчатого с целью скрининга антимикробной активности, в результате которого была выявлена антимикробная активность в отношении клинически значимых патогенных штаммов микроорганизмов: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Candida albicans* (клинический штамм). По итогам работы получена справка на приоритет изобретения РФ «Способ получения настойки листьев дуба черешчатого, обладающей антимикробной активностью».

Изучена диуретическая активность астрагалина – диагностически значимого вещества в листьях дуба черешчатого, обладающего кретининуретическим действием. Проведено исследование острой токсичности экстракционного препарата «Дуба черешчатого листьев настойка», доказана безопасность ее дальнейшего применения в медицинской практике.

Для листьев дуба черешчатого разработаны нормируемые числовые показатели, которые были использованы при создании проекта ФС на новый вид ЛРС «Дуба черешчатого листа» для включения в дальнейшем в ГФ РФ.

**Теоретическая и практическая значимость.** В ходе проведения морфолого-анатомического анализа с использованием люминесцентного метода определены наиболее значимые диагностические признаки для новых видов сырья – листьев и почек дуба черешчатого.

Впервые в РФ методом адсорбционной колоночной хроматографии выделен диагностически значимый флавоноид листьев дуба черешчатого – астрагалин, который в дальнейшем может быть использован в качестве рабочего стандартного образца (РСО), также определен его удельный показатель поглощения ( $E_{1\text{см}}^{1\%} = 300$ ) и рассчитано значение величины  $R_{st}$  (1,22) относительно СО рутина, что может быть использовано для качественной и количественной оценки данного вещества в листьях дуба черешчатого (при наличии РСО астрагалина). Помимо астрагалина впервые из листьев дуба черешчатого выделены вещества 3-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона и моносахарид рамноза, а также флавоноиды изковерцитрин, кверцитрин, афзелин и 3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона, которые выделены из листьев дуба черешчатого впервые в РФ.

Впервые разработаны методики качественного и количественного анализа флавоноидов в листьях и почках дуба черешчатого, а также экстракционного препарата «Дуба черешчатого листьев настойка» методами ТСХ-, ВЭЖХ и дифференциальной УФ-спектрофотометрии. Для количественного анализа суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого предлагается использовать метод дифференциальной УФ-спектрофотометрии с использованием СО рутина при аналитической длины волны 412 нм. Подтверждена возможность использование вещества астрагалина для анализа содержания флавоноидов в листьях дуба черешчатого при длине волны  $406 \pm 2$  нм. Для спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в почках дуба черешчатого предложено использовать СО цинарозида при аналитической длине волны  $400 \pm 2$  нм (значение удельного показателя поглощения  $E_{1\text{см}}^{1\%} = 334$ ).

Впервые выявлено наличие антимикробной активности водно-спиртовых извлечений и экстракционных препаратов на основе листьев, почек и коры дуба черешчатого в отношении некоторых клинически значимых штаммов микроорганизмов *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*. В ходе исследования приведена аргументация наличия антимикробной активности исследуемых морфологических органов сырья дуба черешчатого и обоснована возможность использования в фармацевтической практике экстракционного препарата «Дуба черешчатого листьев настойка» (экстрагент – 70% спирт этиловый).

Доказано наличие диуретической активности диагностически значимого БАВ астрагалина, выделенного из листьев дуба черешчатого, обладающего выраженным креатининуретическим действием. Для экстракционного препарата «Дуба черешчатого листьев настойка» подтверждено отсутствие острой токсичности.

Разработаны числовые показатели качества листьев дуба черешчатого, в том числе содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин (не менее 0,30 %), для проекта ФС на новый вид ЛРС «Дуба черешчатого листа» для включения в ГФ РФ.

По итогам проведенной работы был получен патент РФ «Количественное определение суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого» и 2 справки на приоритет изобретения РФ «Способ количественного определения суммы флавоноидов в почках дуба черешчатого» и «Способ получения настойки листьев дуба черешчатого, обладающей антимикробной активностью».

Результаты диссертационного исследования, используются при осуществлении учебного и научного процесса в ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России: на кафедре фармацевтической технологии с курсом биотехнологий, кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, кафедре управления и экономики фармации, кафедре химии Института фармации, в производственном процессе ЗАО «Самаралектравы», в рабочем процессе в ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», ООО «Самарская фармацевтическая фабрика» и ООО «Лекарь», что подтверждается полученными актами о внедрении.

**Методология и методы исследования.** В основе методологии диссертационного исследования лежит изучение и систематизация имеющихся литературных данных по фармакогностическому исследованию дуба черешчатого *Quercus robur* L., а также некоторых представителей рода *Quercus*, оценка степени разработанности темы и ее актуальности. В связи с поставленной целью и задачами был разработан план выполнения диссертационной работы, определены объекты и методы, используемые в процессе исследования. Объектами исследования являлись образцы сырья представителей рода *Quercus*, собранные на территории Самарской области, промышленные образцы сырья, выпускаемые на территории Российской Федерации, а также водно-

спиртовые извлечения и экстракционные препараты, полученные из сырья представителей рода *Quercus*. Диссертационное исследование выполнялось с применением методов микроскопии (световой и люминесцентной), ТСХ, УФ-спектрофотометрии, ВЭЖХ, а также ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии. Также использовались гистохимические и пробирочные реакции. Математическая обработка результатов исследования осуществлялась с использованием программного обеспечения Microsoft Office Excel (2016) 16.0.5278.1000 MSO 16.0.5278.1000 в соответствии с ГФ РФ XIV издания.

#### **Связь задач исследования с планами научных работ.**

Диссертационное исследование было выполнено в рамках комплексных тем НИОКР СамГМУ «Комплексные исследования по разработке лекарственных средств природного и синтетического происхождения» (№ 115042810034 от 28.04.2015 г.) и НИОКР – «Химико-фармацевтические, биотехнологические, фармакологические и организационно-экономические исследования по разработке, анализу и применению фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов» от 14.05.2019 (№ Гос. регистрации АААА-А19-119051490148-7).

#### **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Результаты морфолого-анатомического исследования и люминесцентного анализа листьев и почек дуба черешчатого, особенности петиолярных признаков представителей рода *Quercus*.
2. Данные исследования химического состава листьев дуба черешчатого, в том числе выделение индивидуальных веществ и их структурный анализ.
3. Результаты исследований по разработке методик качественного анализа листьев и почек дуба черешчатого, а также экстракционного препарата «Дуба черешчатого листьев настойка» с использованием методов ТСХ-, УФ-спектроскопии и ВЭЖХ.
4. Данные результатов исследования по разработке методик количественного определения содержания суммы флавоноидов в листьях и почках дуба черешчатого методом УФ-спектрофотометрии.
5. Результаты сравнительного скринингового исследования антимикробной активности водно-спиртовых извлечений и экстракционных препаратов на основе листьев, почек и коры дуба черешчатого.
6. Результаты исследования диуретической активности БАВ листьев дуба черешчатого и результаты изучения острой токсичности экстракционного препарата «Дуба черешчатого листьев настойка».
7. Данные по разработке нормируемых показателей качества листьев дуба черешчатого в рамках разработки проекта ФС на новый вид лекарственного растительного сырья «Дуба черешчатого листья».

**Степень достоверности.** Достоверность диссертационного исследования подтверждена данными, полученными в процессе проведения экспериментов с использованием световой и люминесцентной микроскопии, ТСХ, ВЭЖХ, адсорбционной колоночной хроматографии, УФ-спектроскопии, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, химических, фармакологических и микробиологических методов анализа.

**Апробация работы.** Результаты диссертационного исследования были доложены на международных, Всероссийских и областных конференциях: Международной научно-практической конференции «90 лет - от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы» (г. Москва, 10–11 июня 2021 г); Международной научно-практической конференции «Разработка

лекарственных средств – традиции и перспективы» (г. Томск, 13-16 сентября 2021 г.); Международной научно-практической конференции «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» (г. Москва, 17–18 декабря 2020 г); Международной научно-практической конференции «От растения до лекарственного препарата» (г. Москва, 04–05 июня 2020 г); Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной медицины и фармации» (г. Витебск, 12–13 мая 2020 г); Аспирантские чтения – 2020: научные исследования и инновации (г. Самара, 15 октября 2020 г); Современные проблемы фармакогнозии (г. Самара, 28 октября 2019 г); Молодые ученые: научные исследования и инновации (г. Самара, 10 октября 2019 г); XII Всероссийская (86-я итоговая) студенческая научная конференция с международным участием "Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты" (г. Самара, 11 апреля 2018 г); II Межвузовская научно-практическая конференция "Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы" (г. Самара, 07 октября 2017 г); V научно-практическая конференция студентов и молодых ученых научно-образовательного медицинского кластера "Нижеволжский" "Физика и медицина: создавая будущее" (г. Самара, 10 декабря 2021 г); Аспирантские чтения - 2021: Молодые ученые – медицине (Самара, 13–14 октября 2021 г.); Всероссийская Научно-практическая Онлайн-конференция с международным участием "Фармацевтическое образование СамГМУ. история, современность, перспективы", посвященная 50-летию фармацевтического образования СамГМУ (Самара, 26–27 октября 2021 г.).

**Публикации.** Наиболее значимые материалы диссертационного исследования опубликованы в 18 печатных работ по теме диссертации, из них 6 статей в журналах, рекомендованных Высшей аттестационной комиссией при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации, из которых 2 статьи в журналах, входящих в международные базы цитирования Scopus и WoS. Получен 1 патент Российской Федерации и 2 справки на приоритет изобретения РФ (Приложение № 2). Материалы диссертации были неоднократно представлены на международных, Всероссийских и региональных конференциях.

**Внедрение результатов исследования.** Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, используются в учебном и научном процессе Самарского государственного медицинского университета на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, на кафедре химии Института фармации, на кафедре фармацевтической технологии с курсом биотехнологий, на кафедре управления и экономики фармации. Кроме того, полученные результаты используются в рабочем процессе в ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», ООО «Самарская фармацевтическая фабрика», ООО «Лекарь» и в производственном процессе ЗАО «Самаралектравы».

**Личный вклад автора.** Приведенные результаты диссертационного исследования получены автором лично. Автором были изучены морфолого-анатомические особенности строения листьев и почек дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), выявлены диагностически значимые признаки и проведен их люминесцентный анализ. Выполнено сравнительное исследование петиолярной анатомии листьев некоторых представителей рода *Quercus*: дуба скального, дуба летнего, дуба фастигиата, дуба Мюлленберга. Выявленные диагностические признаки листьев дуба черешчатого заключаются в специфике строения и люминесценции поперечных сечений черешковой части листа, характере опушения листа, наличии кристаллических включений ( друз) в поперечных срезах листа, а также в специфике строения и люминесценции проводящей системы листа. Определены особенности

люминесценции тканей листьев и почек дуба, а также объяснена связь люминесценции с содержанием и локализацией основных действующих веществ.

Проведено исследование фитохимического состава листьев дуба черешчатого методом адсорбционной колоночной хроматографии, в ходе которого выделено и идентифицировано 7 индивидуальных соединений: из которых вещества 3-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона и рамноза выделены впервые для листьев дуба черешчатого, а флавоноиды астрагалин, изокверцитрин, кверцитрин, афзелин и 3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона выделены впервые из листьев дуба черешчатого в РФ.

Автором разработаны методики качественного и количественного анализа флавоноидов в листьях, почках и коре дуба черешчатого, приведены рекомендации по использованию методов ТСХ, ВЭЖХ, УФ-спектроскопии для качественного и количественного анализа экстракционного препарата «Дуба черешчатого листьев настойка»

Изучена антимикробная активность водно-спиртовых извлечений и экстракционных препаратов, полученных на основе листьев и почек дуба черешчатого в отношении клинически значимых штаммов микроорганизмов: *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*. Проведено исследование диуретической активности БАВ астрагалина и острой токсичности нового антимикробного ЛП «Дуба черешчатого листьев настойка».

Разработаны числовые показатели нового вида ЛРС «Дуба черешчатого листа», которые включены в проект ФС для включения в ГФ РФ.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Основные положения диссертационной работы соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

**Объем и структура работы.** Диссертационная работа изложена на 216 (с приложениями) страницах машинописного текста. Результаты исследования изложены в форме 29 таблиц и 54 рисунков. Данная работа включает в себя введение, обзор литературы, объекты и методы исследования, четыре главы, включающие результаты исследований, выводы и заключение, список литературы, который состоит из 174 источника, 63 из которых – на иностранном языке, а также приложения.

Во введении содержится описание актуальности темы представленного исследования, цель, задачи, научная новизна и практическая значимость, основные положения, выносимые на защиту, сведения о публикациях по теме исследования и апробации работы.

Глава 1 представляет собой обзор опубликованных результатов фармакогностических исследований дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) отечественных и иностранных авторов. В главе описаны данные, касающиеся ареала, химического состава, подходов к стандартизации коры дуба черешчатого. Также описаны фармакологические свойства сырья и препаратов дуба, применяемых в медицинской практике.

Глава 2 включает описание объектов и методов исследования.

Глава 3 посвящена результатам исследования по морфолого-анатомическому изучению листьев и почек дуба черешчатого с использованием люминесцентного метода. Также в главе приводятся данные сравнительного исследования петиолярной анатомии дуба черешчатого и его близкородственных видов, произрастающих на территории Самарской области.

В главе 4 приведены результаты выделения индивидуальных соединений из листьев дуба черешчатого, данные по их химическому строению и структуре.

Глава 5 посвящена разработке методик качественного и количественного анализа листьев и почек дуба черешчатого с использованием ТСХ и УФ-спектрофотометрии. В главе также приводятся результаты исследования экстракционного препарата настойки листьев дуба и индивидуальных веществ методом ВЭЖХ анализа. Приведены результаты исследования по определению динамики накопления (биоаккумуляции) суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого. Приведены рекомендуемые числовые показатели сырья, включенные в проект ФС на новый вид ЛРС «Дуба черешчатого листа».

Глава 6 содержит результаты скринингового исследования антимикробной активности водно-спиртовых извлечений и спиртовых настоек листьев, почек и коры дуба черешчатого, предварительные результаты исследования диуретической активности астрагалина, а также результаты изучения острой токсичности спиртовой настойки листьев дуба черешчатого.

Диссертационная работа завершается выводами, заключением, практическими рекомендациями, описанием перспектив дальнейших исследований и списком литературы.

В приложениях к диссертации приведены акты внедрения (Приложение № 1); патенты РФ: «Способ количественного определения суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого» (№ 2751189, заявка № 2020133909; дата регистрации 12.07.2021); приоритетная справка на изобретение РФ «Способ количественного определения суммы флавоноидов в почках дуба черешчатого» (заявка № 2021131121; дата поступления 25.10.2021; W21066025); приоритетная справка на изобретение РФ «Способ получения настойки листьев дуба черешчатого, обладающей антимикробной активностью» (заявка № 2021131123; дата поступления 25.10.2021; W21066027) (см. Приложения № 2). В приложении к диссертации приведена сравнительная таблица исследования морфологических признаков листьев рода *Quercus* (Приложение № 3); данные по фитохимическому исследованию листьев перспективных видов рода *Quercus* (Приложение № 4); таблицы результатов изучения антимикробной активности ЛРС дуба черешчатого (Приложение № 5). В приложении № 6 представлены проекты ФС на новые виды ЛРС «Дуба черешчатого листа» и «Дуба черешчатого почки», гербарные образцы видов дуба, сырье которых было использовано в процессе выполнения диссертационного исследования.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Объекты и методы исследования

Объектами диссертационной работы являлись образцы листьев дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), дуба скального – *Q. petraea* Liebl.; дуба красного – *Q. rubra* L.; дуба летнего фастигиата – *Q. robur* var. *fastigiata* (Lam.) Spach.; дуба монгольского – *Q. mongolica* Fisch. ex Ledeb.; дуба крупноплодного – *Q. macrocarpa* Michaux и дуба Мюлленберга – *Q. Muehlenbergii* Engelman, культивируемые на территории Самарской области. Образцы сырья заготавливались с 2019 по 2021 гг.

В рамках диссертационной работы исследовались: водно-спиртовые извлечения листьев, коры и почек дуба черешчатого, образцы экстракционных препаратов (настоек) листьев, коры и почек дуба черешчатого в соотношении «сырье-экстрагент» – «1:5» на 40%, 70% и 96% этиловом спирте, а также индивидуальные вещества: астрагалин (3-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидроксифлавона); афзелин (3-О-α-L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидроксифлавона); кверцитрин (3-О-α-L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона); изокверцитрин (3-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,31,4'-пентагидроксифлавона); 3-О-α-L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-

метоксифлавона; 3-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона; рамноза; рутин; кверцетин; цинарозид; кемпферол; танин; галловая кислота; катехин.

Морфолого-анатомическое исследование осуществлялось с применением цифровых микроскопов марки «Motic DM-1802», «Motic DM-39C-N9GO-A» и «ZEISS ZEN 2» (лицензионное программное обеспечение ZEISS Software Licensing | V1.0 en 04 / 2018) с увеличениями x40, x100, x400, а также люминесцентного микроскопа марки «Альтами» «ЛЮМ-2» с использованием голубого (330-400 нм) и желтого (420-550 нм) светофильтров. Оцифровка результатов микроскопического анализа и определение размерности гистологических элементов проводились с помощью программного обеспечения «Motic Images Plus 2.0 ML» (PC&Mac) 1301100100224/001 20111017; DM1 102-10250-00-09820.

Изучение химического состава листьев дуба черешчатого проводили методом адсорбционной колоночной хроматографии с использованием силикагеля марки L 40/100 мкм и L 100/250 мкм (Чехия) и полиамида (*Woelm Pharma*, Германия). Для исследования методом ТСХ извлечений из изучаемого сырья, выделенных веществ и разработанных ЛРП использовали пластинки марки «Sorbfil ПТСХ-АФ-А-УФ» и «ПТСХ-П-А-УФ» (Россия). Хроматографический анализ осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») в градиентном режиме при использовании стальной колонки «КАХ-6-80-4» (№2; 2 мм x80 мм; Сепарон-С18 7 мкм). Спектрофотометрическое исследование извлечений из сырья и разработанных препаратов проводили на спектрофотометрах «Specord 40» (Analytik Jena) и «СФ-2000» в кюветах с толщиной слоя 10 мм в диапазоне длин волн от 190 нм до 700 нм. Спектры <sup>1</sup>H-ЯМР получали на приборе «Bruker AM 300», спектры <sup>13</sup>C-ЯМР – на приборе «Bruker DRX 500», регистрацию масс-спектров электронного удара проводили электроструйной ионизацией на приборе «MicrOTOF» спектрометре при энергии ионизирующих электронов 70 эВ и колебании температурного режима ионного источника от 100 до 250 °С.

Образцы настоек изучаемых видов сырья дуба черешчатого получали методом дробной перколяции на 70% спирте этиловом в соотношении «сырье-экстрагент» 1:5.

С использованием фармакологических методов анализа проводилось изучение влияния выделенного нами из листьев дуба черешчатого вещества астрагалина на выделительную функцию почек. Также проводилось исследование острой токсичности разработанного ЛРП настойки листьев дуба черешчатого. Для определения антимикробного действия извлечений из изучаемого вида сырья использовался метод двойных серийных разведений (пробирочный, макрометод) на питательном бульоне Мюллера-Хинтона (Bio-Rad, США) с использованием штаммов Американской коллекции типовых культур: *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), а также *Candida albicans* (клинический штамм).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 1. Морфолого-анатомическое исследование листьев дуба черешчатого

Дополнены и определены основные диагностически значимые признаки нового вида ЛРС «Дуб черешчатого листа», которые заключаются в следующем:

1) Наличие устьиц аномоцитного типа на нижней стороне листа с характерной люминесценцией: при  $\lambda=420$  нм – устьица желтые по окружности и зеленовато-желтые внутри; при

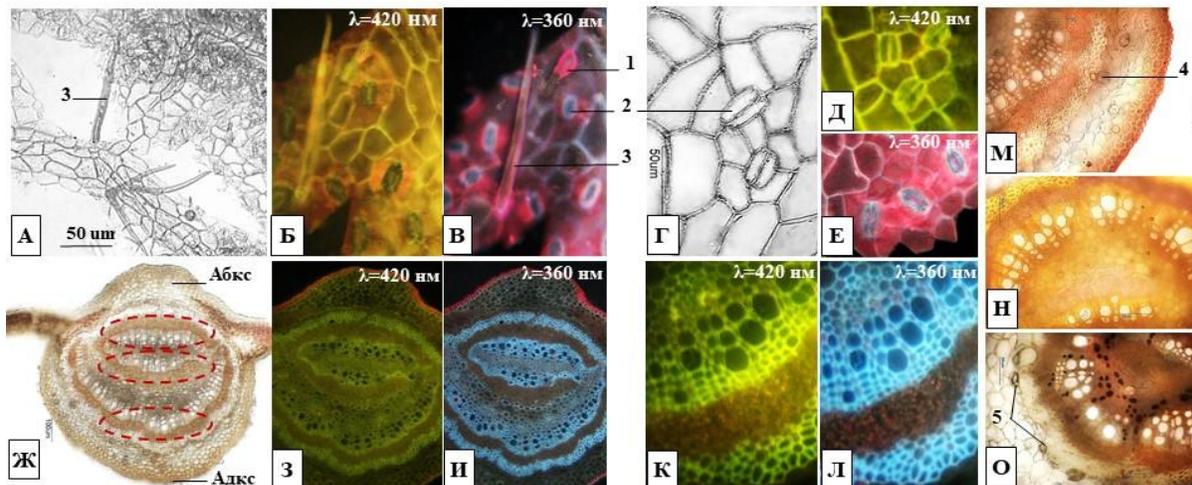
$\lambda=360$  нм края устьиц розовые (характерно для СО рутина), в центре – голубовато-зеленые, что характерно для веществ кемферола и кверцетина (рис. 1 и 2);

2) Опушение эпидермиса и жилки нижней стороны листа одиночными простыми и ветвистыми волосками с гладкой поверхностью (длина до 100 мкм) (рис. 1А). Кроме того, присутствуют трихомы, головка которых светится желто-оранжевым светом при  $\lambda=420$  нм и розово-красным светом при  $\lambda=360$  нм (рис. 1В), что характерно для веществ астрагалина, рутина и кверцитрина (рис. 2)

3) Листовая пластинка дорсовентрального типа. Эпидемис листа на поперечном срезе люминесцирует желто-оранжевым светом при  $\lambda=420$  нм и розово-красным при  $\lambda=360$  нм (характерно для рутина) (рис. 13, 1И);

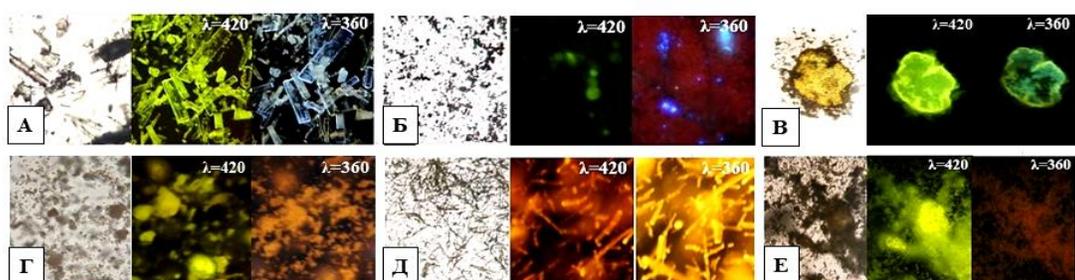
4) Основной объем жилки занимает проводящая система, представленная в виде 3-х закрытых крупных блоков плотно сомкнутых коллатеральных пучков, отмеченных на рисунке 1Ж штрих-пунктиром (рис. 1Ж). В абаксиальной части присутствует блок колленхимы (свечение при  $\lambda=420$  нм – желто-зеленое, при  $\lambda=360$  нм – голубоватое), в адаксиальной части заметно развит блок склеренхимы (свечение при  $\lambda=420$  нм – яркое желто-зеленое, при  $\lambda=360$  нм – яркое голубоватое, что характерно для дубильных веществ) (рис. 1Ж);

5) При проведении гистохимических реакций микропрепаратов отмечается их лигнификация при ярко-желтом окрашивании тканей проводящей системы и склеренхимы (реакция с серноокислым анилином) (рис. 1Н). Отмечается окрашивание липофильных клеток кутикулы и механического пояса в оранжево-красный цвет (реакция с 5% раствором Судана III) (рис. 1М). В центре поперечного среза наблюдается темно-синее окрашивание содержимого клеток (реакция с раствором Люголя) (рис. 1О). На поперечных срезах в клетках эпидермиса и проводящей системы присутствуют друзы неправильной формы. Клетки ксилемы и блока склеренхимы светятся ярко-зеленым цветом при  $\lambda=420$  нм и ярко-голубым при  $\lambda=360$  нм, что характерно для дубильных веществ (галловая кислота) (рис. 13, 1И).



**Рисунок 1 – Диагностические признаки листьев дуба черешчатого.** А – эпидермис нижней стороны листа ( $\times 100$ ); Б, В – люминесценция эпидермиса нижней стороны при  $\lambda=420$  и  $\lambda=360$  нм соответственно ( $\times 400$ ); Г, Д, Е – устьица нижней стороны листа: без облучения, при  $\lambda=420$  и при  $\lambda=360$  нм соответственно ( $\times 400$ ); Ж, З, И – поперечный срез медиальной части: без облучения, при облучении  $\lambda=420$  и при  $\lambda=360$  нм соответственно ( $\times 100$ ); К, Л – проводящая система на поперечном срезе при  $\lambda=420$  и  $\lambda=360$  нм соответственно ( $\times 400$ ); М – фрагмент поперечного сечения после окраски 0,5 % раствором Судана III ( $\times 400$ ); Н – фрагмент поперечного сечения после окраски 10 % раствором серноокислого анилина ( $\times 400$ ); О – окраска раствором Люголя, поперечный срез ( $\times 400$ ).

Обозначения: 1 – трихома; 2 – устьице; 3 – одноклеточный волосок; 4 – друзы; 5 – монокристаллы.



**Рисунок 2 – Сравнительная люминесценция стандартных образцов, используемых в морфолого-анатомическом анализе. Обозначения: А – СО галловой кислоты; Б – СО рутина; В – СО кемферола; Г – СО кверцитрина; Д – СО кверцетина; Е – астрагалин.**

Сравнительный анализ петиолярной анатомии листьев дуба черешчатого и его некоторых близкородственных видов наглядно показал четкие различия в очертаниях поперечных срезов черешков (в абаксиальной и адаксиальной частях), опушении и строении проводящей системы, имеющих видовую специфичность. Что позволяет использовать метод петиолярной диагностики для целей при установлении подлинности сырья. Результаты сравнения петиолярной анатомии близкородственных видов рода *Quercus* представлены в таблице 1 (табл. 1).

**Таблица 1 – Сравнительная петиолярная анатомия поперечных срезов листовых пластинок *Quercus robur* L. и некоторых представителей рода *Quercus* L.**

Фрагмент среза	Название вида			
	<i>Q. robur</i>	<i>Quercus petraea</i>	<i>Q. fastigiata</i>	<i>Q. Muehlenbergii</i>
Базальная часть				
Медиальная часть				
Апикальная часть				

## 2. Фитохимическое исследование листьев дуба черешчатого

В ходе исследования химического состава листьев дуба черешчатого методом адсорбционной жидкостной колоночной хроматографии впервые из листьев дуба черешчатого выделены и идентифицированы вещества 3-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона и рамноза. Впервые в РФ из листьев дуба черешчатого выделены флавоноиды: астрагалин; афзелин; кверцитрин; изокверцитрин (3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид 3,5,7,31,4'-пентагидроксифлавона) и 3-О- $\beta$ -D-

гликопиранозид 3,5,7,4'-тетра гидрокси-3',-метоксифлавона (табл. 2). Идентификация выделенных веществ проводилась с использованием методов ТСХ-, УФ-спектрофотометрии,  $^1\text{H}$ -ЯМР-,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии, а также масс-спектрометрии (табл. 2). Масс-спектры наиболее значимого вещества для листьев дуба черешчатого астрагалина и его агликона представлены на рисунке 3.

**Таблица 2 – Характеристики веществ, выделенных из листьев дуба черешчатого методом колоночной хроматографии**

№ п/п	Название соединения, брутто-формула	Масс-спектр, m/z	Структурная формула	Описание вещества
1.	Астрагалин (3-О-β-D-гликопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси флавона) (C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> )	471.0898 [M+Na] <sup>+</sup>		Кристаллическое вещество светло-желтого цвета
2.	Афзелин (3-О-α-L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетра гидроксифлавона) (C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>10</sub> )	309.0370 [M+Na] <sup>+</sup>		Кристаллическое вещество светло-желтого цвета
3.	Кверцитрин (3-О-α-L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидрокси флавона) (C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> )	471.0897 [M+Na] <sup>+</sup>		Кристаллическое вещество светло-желтого цвета
4.	Изокверцитрин (3-О-β-D-гликопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидрокси флавона) (C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub> )	501.0003 [M+K] <sup>+</sup>		Кристаллическое вещество светло-желтого цвета
5.	3-О-α-L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона (C <sub>22</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub> )	501.0006 [M+Na] <sup>+</sup>		Аморфное вещество светло-желтого цвета
6.	3-О-β-D-гликопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона (C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> O <sub>12</sub> )	501.0006 [M+Na] <sup>+</sup>		Кристаллическое вещество светло-желтого цвета
7.	Рамноза (C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub> )	187.0557 [M+Na] <sup>+</sup>		Призматические кристаллы белого цвета

Для идентификации агликонов проводился кислотный гидролиз флавоноидных гликозидов в присутствии 2 % HCl на кипящей водяной бане в течение 2 часов. После проведения кислотного гидролиза отмечается сдвиг хроматографических зон для анализируемых веществ с  $R_f = 0,66$  до  $R_f = 0,54$ . Наличие D-глюкозы в структуре астрагалина и L-рамнозы в структурах афзелина и кверцитрина подтверждали методом бумажной хроматографии.

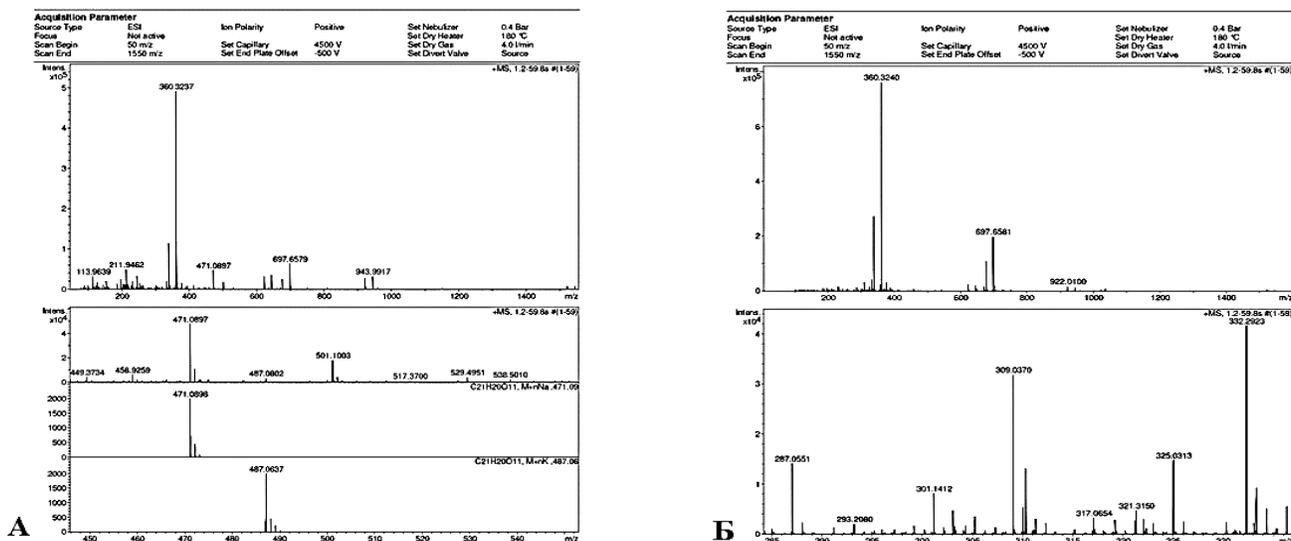


Рисунок 3 – Масс-спектр астрагалина (А) и агликона астрагалина (Б)

Таким образом, проведено исследование химического состава листьев дуба черешчатого методом адсорбционной колоночной хроматографии, в ходе которого выделены 7 веществ, а также установлена их структура.

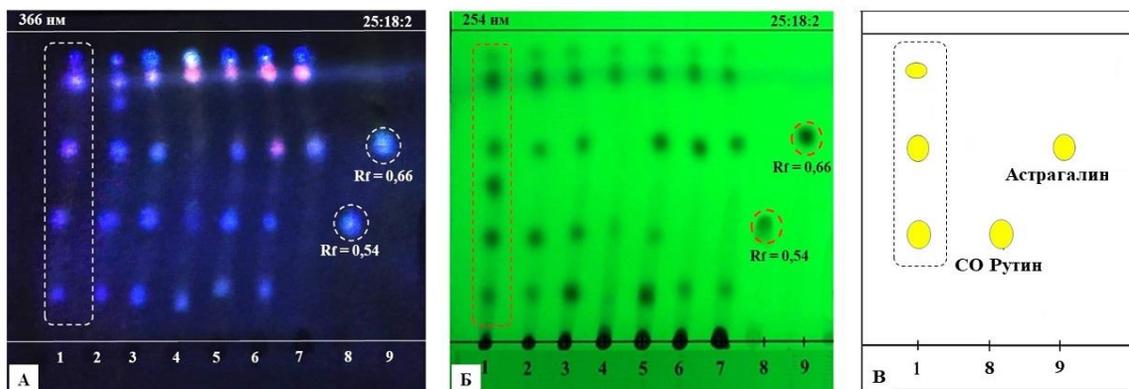
### 3. Разработка методик качественного и количественного анализа листьев дуба черешчатого

Результаты фитохимического изучения листьев дуба черешчатого использовались при разработке методик качественного и количественного анализа сырья данного растения.

#### 3.1. Качественный анализ листьев рода *Quercus* методом тонкослойной хроматографии

Экспериментально подобраны условия проведения ТСХ-анализа водно-спиртовых извлечений и экстракционного препарата настойки листьев дуба черешчатого, которые заключаются в использовании хроматографической системы «трихлорметан : спирт этиловый : вода» в соотношении 25:18:2. При просмотре в УФ-свете при длине волны 366 нм и после проявления раствором диазобензолсульфокислотой (ДСК) вещество астрагалин детектируется в виде зоны адсорбции  $R_f$  около 0,66 (астрагалин) и СО рутина в виде зоны адсорбции  $R_f$  около 0,54 (рис. 4).

В связи с отсутствием СО астрагалина нами предложено использовать для целей стандартизации СО рутина, как вещества, близкого к астрагалину по структуре и спектральным характеристикам. По этой причине нами предложен показатель  $R_{st}$ , который равен отношению коэффициента удерживания ( $R_f$ ) астрагалина в настойке листьев дуба к коэффициенту удерживания рутина ( $R_f$ ) равный  $\sim 1,22$  (рис. 4).



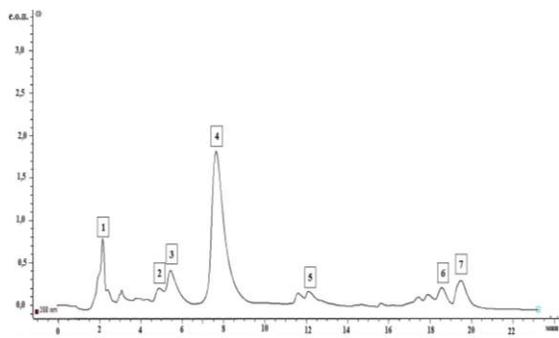
**Рисунок 4 – Хроматографические профили растворов извлечений листьев представителей рода *Quercus* на 70% спирте этиловом в системе растворителей «трихлорметан : спирт этиловый : вода» в соотношении 25:18:2: А – детектирование в УФ-свете при  $\lambda=366$  нм;**

**Б – детектирование в УФ-свете при  $\lambda=254$  нм; В – обработка раствором ДСК.**

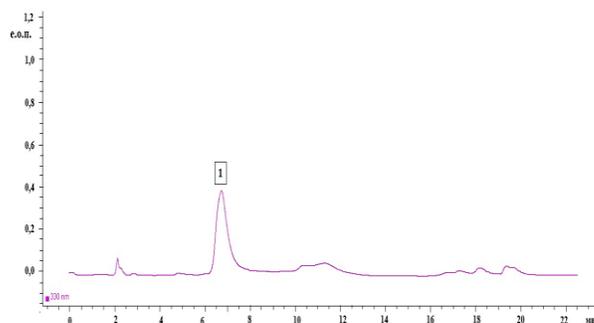
Обозначения: 1 – *Q. robur* L.; 2 – *Q. robur fastigiata*; 3 – *Q. petraea* Liebl.; 4 – *Q. rubra* L.; 5 – *Q. Muehlenbergii* Engelmann; 6 – *Q. mongolica* Fisch. ex Ledeb.; 7 – *Q. macrocarpa* Michaux; 8 – СО рутина; 9 – астрагалин.

### 3.2. Качественный анализ настойки листьев дуба черешчатого методом ВЭЖХ

Сравнение значений времени удерживания пиков веществ на ВЭЖХ-хроматограмме извлечения листьев дуба черешчатого и времени удерживания пиков индивидуальных веществ позволило идентифицировать в извлечении рутин, изокверцитрин, кверцитрин, астрагалин, афзелин, кверцетин и кемпферол, выделенных ранее методом колоночной хроматографии. Результаты исследования флавоноидного состава, полученные с использованием метода ВЭЖХ, позволяют рекомендовать данный метод с целью подтверждения подлинности листьев дуба черешчатого (рис. 5 и 6). В качестве подвижной фазы использовалась система «ацетонитрил : вода» в градиентном режиме с использованием следующих соотношений: 25-75 (1000 мкл), 4-6 (600 мкл), 6-4 (800 мкл) с добавлением 1 % ледяной уксусной кислоты от объема воды. Присутствие перечисленных веществ подтверждалось путем их добавок к настойке с последующим ВЭЖХ-анализом при аналогичных условиях (рис. 5). ВЭЖХ-хроматограмма астрагалина представлена на рисунке 6.



**Рисунок 5 – ВЭЖХ-хроматограмма настойки листьев дуба черешчатого. Обозначения: 1 – СО рутина; 2 – СО изокверцитрина; 3 – СО кверцитрина; 4 – астрагалин; 5 – СО афзелина;**

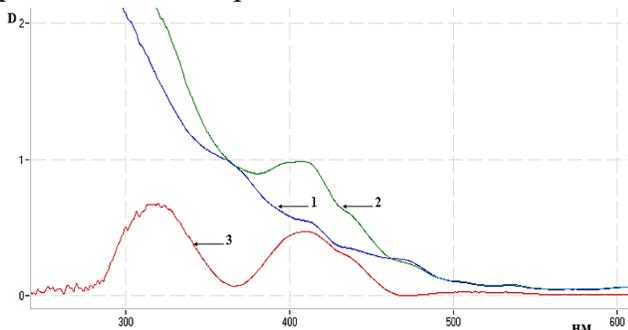


**Рисунок 6 – ВЭЖХ-хроматограмма астрагалина. Обозначения: 1 – индивидуальное вещество астрагалин.**

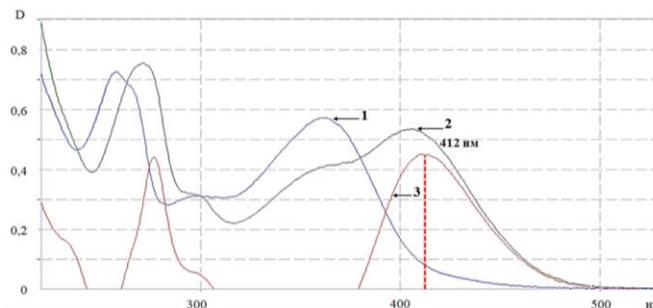
6 – СО кверцетина; 7 – СО кемпферола.

### 3.3. Качественный анализ листьев дуба черешчатого методом УФ-спектроскопии

При изучении электронных спектров водно-спиртового извлечения листьев дуба черешчатого обнаруживаются характерные для флавоноидов, в частности флавонолов, 2 максимума поглощения: коротковолновый при длине волны  $265 \pm 2$  нм и длинноволновый при  $350 \pm 2$  нм (рис. 7-1).



**Рисунок 7 – Электронные спектры растворов водно-спиртового извлечения из листьев дуба черешчатого.** Обозначения: 1 – электронный спектр извлечения (прямая спектрофотометрия); 2 – электронный спектр извлечения с добавлением  $+AlCl_3$ ; 3 – дифференциальный спектр извлечения.



**Рисунок 8 – Электронные спектры поглощения водно-спиртового раствора рутина.** Обозначения: 1 – электронный спектр СО рутина (прямая спектрофотометрия); 2 – электронный спектр СО рутина с  $+AlCl_3$ ; 3 – дифференциальный спектр СО рутина.

В присутствии  $AlCl_3$  наблюдается bathochromный сдвиг длинноволновой полосы в области 270 и 395 нм, что подтверждает флавоноидную природу веществ в водно-спиртовом извлечении листьев дуба черешчатого (рис. 7-2). В дифференциальном варианте электронного спектра характерны два максимума поглощения при аналитических длинах волн 276 и 412 нм (рис. 7 и 8). Отмечается схожее строение профиля электронных спектров извлечения листьев дуба черешчатого с профилем электронных спектров СО рутина (рис. 8). Исходя из этого, в дальнейшем, для проведения стандартизации листьев дуба черешчатого предлагается использовать СО рутина и проводить пересчет на данное вещество при аналитической длине волны 412 нм (дифференциальный вариант) (рис. 8).

### 3.4. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого

В результате проведенного эксперимента определены оптимальные параметры экстракции БАВ из листьев дуба черешчатого: экстрагент – 80 % этанол; соотношение «сырьё-экстрагент» – 1:50; время экстракции – 30 мин; степень измельчения – 2 мм. В результате разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого с использованием метода дифференциальной УФ-спектрофотометрии при аналитической длине волны 412 нм в пересчете на СО рутина. Использование предложенных условий в методике обосновано тем, что при добавлении к водно-спиртовому извлечению раствора  $AlCl_3$  наблюдается bathochromный сдвиг длинноволновой полосы флавоноидов с максимумом поглощения в дифференциальном варианте при длине волны 412 нм, что соответствует максимуму спиртового раствора рутина (рис. 7 и 8).

### Методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 80 % этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до  $\pm 0,01$ . Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 30 мин. Затем колбу охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (красная полоса).

Испытуемый раствор готовят следующим образом: 2 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 мл 3 % спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (испытуемый раствор А). Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 412 нм через 40 минут после приготовления. В качестве раствора сравнения используют раствор, полученный следующим образом: 2 мл извлечения (1:50) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора спиртом этиловым 96 % до метки.

Приготовление раствора СО рутина. Около 0,0207 г (точная навеска) рутина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл 70 % этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 70 % этиловым спиртом до метки (раствор А рутина). 1 мл раствора А рутина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 1 мл 3 % спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (испытуемый раствор Б рутина). Измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 412 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор, который готовят следующим образом: 1 мл раствора А рутина помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (раствор сравнения Б рутина).

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах ( $X$ ) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 2 \cdot 50 \cdot 25 \cdot (100 - W)}$$

где  $A$  – оптическая плотность испытуемого раствора;  $A_0$  – оптическая плотность раствора СО рутина;  $m$  – масса сырья, г;  $m_0$  – масса СО рутина, г;  $W$  – потеря в массе при высушивании в процентах. Значение удельного показателя поглощения – 240.

Метрологическая оценка результатов эксперимента проводилась в соответствии с требованиями ГФ РФ «ОФС.1.1.0013.15». Результаты метрологической оценки методики представлены в таблице 3. Ошибка единичного определения суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого с доверительной вероятностью 95 % составляет  $\pm 0,32$  % (табл. 3).

**Таблица 3 – Метрологическая оценка методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого *Quercus robur* L.**

№ п/п	1	2	3	4	5	6	7	8
-------	---	---	---	---	---	---	---	---

Показатели метрологической оценки	$f$	$\bar{X}$	$S^2$	$S$	$P, \%$	$t(P, f)$	$\pm x$	$\varepsilon, \%$
Извлечения из листьев дуба	10	1,63	0,000307	0,017529	95	2,113	0,005285	0,32

Валидационная оценка разработанной методики проводилась в соответствии с ГФ РФ ОФС.1.1.0012.15 по показателям: специфичность, линейность, правильность. Специфичность методики определялась по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов листьев дуба черешчатого и СО рутина с алюминием хлоридом. Линейность методики определяли для серии растворов рутина (с концентрациями в диапазоне от 0,00880 до 0,03520 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,98953. Правильность методики определяли методом добавок путем добавления раствора рутина с известной концентрацией (25 %, 50 % и 75 %) к испытуемому раствору. При этом средний процент восстановления составил 98 %.

Таким образом, листья дуба черешчатого являются перспективным источником БАВ, с содержанием суммы флавоноидов 1,63 % (нижний предел содержания – не менее 0,30 %).

В виду сходства электронных спектров поглощения водно-спиртового извлечения листьев дуба черешчатого и вещества астрагалина допускается также проводить количественное определение суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого в пересчете на астрагалин (при наличии его СО) при аналитической длине волны 406 нм (значение удельного показателя поглощения астрагалина равно 300).

### 3.5. Определение динамики накопления суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого

Результаты анализа содержания суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого, заготовленных в период с мая по сентябрь 2019-2021 гг., показывают, что максимальное содержание флавоноидов в листьях дуба черешчатого приходится на период «конец мая-начало июня». Таким образом, оптимальным временем сбора листьев дуба черешчатого является конец мая-начало июня, в период их распускания.

### 3.6. Числовые показатели для нового вида ЛРС «Дуба черешчатого листа»

На основании полученных данных для листьев дуба черешчатого в соответствии с методиками, описанными в ГФ РФ XIV издания были определены следующие показатели качества сырья: влажность – не более 9%, содержание золы общей не более 10 %, золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте не более 3 %, содержание частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм – не более 5 %. Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 70% спиртом этиловым, в листьях дуба черешчатого составляло – не менее 35 %, содержание суммы флавоноидов не менее 0,30 %, дубильных веществ – не менее 2 %. В результате проведенных исследований числовые показатели были рекомендованы в проект ФС для нового вида ЛРС «Дуба черешчатого листа».

## 4. Обоснование способа получения и методик стандартизации ЛРП «Дуба черешчатого листьев настойка»

Обоснованы подходы к анализу препарата настойки листьев дуба черешчатого, полученной на 70 % спирте этиловом методом дробной перколяции в соотношении «1:5». Содержание суммы

флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии в полученной настойке на 70 % спирте этиловом в пересчете на СО рутина составило  $0,24 \pm 0,003$  %, в пересчете на астрагалин –  $0,33 \pm 0,003$  %. В результате исследования антимикробной активности настойки в отношении штаммов микроорганизмов *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, установлено подавление роста исследуемых штаммов. В частности, при разведении в 16 раз задерживается рост штамма *P. aeruginosa* и штамма *S. aureus*, при разведении в 32 раза – задержка роста *E. coli* и при разведении в 64 раза – *C. albicans*. Учитывая полученные результаты, предлагается новый антимикробный препарат «Дуба черешчатого листьев настойка».

В результате исследования диуретической активности было подтверждено наличие выраженного креатининуретического действия для вещества астрагалина, выделенного из листьев дуба черешчатого.

На основании результатов проведенных исследований по изучению острой токсичности препарат «Дуба черешчатого листьев настойка» был отнесен к IV классу токсичности – малоопасные вещества (ГОСТ 12.1.007-76).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в процессе выполнения научно-исследовательской работы в рамках заявленной темы были получены следующие результаты:

1. В ходе морфолого-анатомического исследования выявлены диагностические признаки перспективных видов сырья *Quercus robur* L.:

- для листьев дуба черешчатого характерно: опушение эпидермиса и жилки нижней стороны листа простыми одноклеточными волосками и железистыми трихомами с характерной розово-красной люминесценцией (при  $\lambda=360$  нм). В жилках листа содержатся кристаллические включения в виде друз и монокристаллов. В зоне проводящей системы листа (ксилеме) локализованы вещества флавоноидной природы (астрагалин, кверцитрин и рутин). Дубильные вещества локализованы в механической ткани (склеренхима) и клетках эпидермиса.

- для близкородственных видов рода *Quercus* выявлены особенности петиолярной анатомии, которые заключаются в отличии очертаний поперечных срезов в базальной, медиальной и апикальной частях, а также в характере опушения эпидермиса;

- для почек дуба черешчатого отмечены особенности в расположении крупных фрагментов соцветий и примордиев (V -образное), характере кроющих чешуй («сложенное»), в опушении эпидермиса одноклеточными простыми кроющими волосками и трихомами, а также в характере структуры проводящей системы.

2. Впервые из листьев дуба черешчатого методом адсорбционной колоночной хроматографии выделены и идентифицированы вещества 3-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона и рамноза. Впервые в РФ из листьев дуба черешчатого выделены флавоноиды – астрагалин, афзелин, кверцитрин, изокверцитрин и 3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавоны. Выделенные вещества идентифицированы методами ТСХ-, УФ-спектрофотометрии,  $^1\text{H}$ -ЯМР-,  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектроскопии, а также масс-спектрометрии.

3. Предложено для определения подлинности листьев дуба черешчатого использовать метод ТСХ (система «трихлорметан : этиловый спирт : вода» 25:18:2) в присутствии СО рутина ( $R_f = 0,54$ ) и диагностически значимого компонента астрагалина ( $R_f = 0,66$ ). Предлагается также использовать метод УФ-спектроскопии (в электронном спектре поглощения водно-спиртового извлечения в

дифференциальном варианте имеется два максимума: при длине волны  $320 \pm 2$  нм и  $406 \pm 2$  нм) с использованием СО рутина. Кроме того, разработаны методики анализа нового антимикробного препарата «Дуба черешчатого листьев настойка» методами ТСХ, ВЭЖХ- и УФ-спектрофотометрии. В процессе качественного анализа настойки листьев дуба черешчатого методом ВЭЖХ подтверждено наличие 7 веществ: рутина, изокверцитрина, кверцитрина, астрагалина, афзелина, кверцетина и кемпферола.

4. Разработана и научно обоснована методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях *Quercus robur* L. спектрофотометрическим методом с использованием СО рутина. Содержание суммы флавоноидов находится в пределах от 0,30 % до 1,63 % (аналитическая длина волны 412 нм).

Разработана и научно обоснована методика количественного определения суммы флавоноидов в почках *Quercus robur* L. спектрофотометрическим методом с использованием СО цинарозида. Содержание флавоноидов находится в пределах от 0,27 % до 0,44 % (аналитическая длина волны 400 нм).

5. Обнаружена антимикробная активность в условиях *in vitro* для водно-спиртовых извлечений и экстракционных препаратов (настоек) на основе коры, листьев и почек дуба черешчатого. Для настойки листьев дуба черешчатого отмечается максимальная задержка роста микроорганизмов *E. coli*, *C. albicans* при разведении в 32 и 64 раза соответственно; в отношении *P. aeruginosa*, *S. aureus* при разведении в 16 раз. Учитывая полученные результаты, и, исходя из данных о содержании суммы флавоноидов, обоснована целесообразность использования растительного экстракционного препарата «Дуба черешчатого листьев настойка».

6. Проведено исследование диуретической активности вещества астрагалина, для которого обнаружено и подтверждено креатининуретическое действие; результаты исследования острой токсичности «Дуба черешчатого листьев настойка» (экстрагент - 70 % этанол), подтверждают безопасность использования препарата в медицинской практике.

7. Регламентированы показатели качества для листьев *Quercus robur* L. Предложен нижний предел содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин – не менее 0,30 %, дубильных веществ не менее 2 %; экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 % не менее 35 %; влажность не более 9 %. На основе полученных данных разработан проект ФС на новый вид ЛРС – «Дуба черешчатого листа».

**Практические рекомендации.** Результаты диссертационной работы будут способствовать совершенствованию подходов к стандартизации ЛРС, содержащего флавоноиды, и могут быть использованы в учебном процессе по дисциплинам «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия», а также в организациях и предприятиях, специализирующихся в области создания, стандартизации, сертификации и контроля качества лекарственных средств.

**Перспективы дальнейшей разработки темы.** Проведение диссертационного исследования имеет научно-практическое значение для фармакогнозии и фармацевтической химии с целью дальнейшего изучения химического состава растений, содержащих флавоноиды, а также для разработки методик анализа и стандартизации ЛРС дуба черешчатого, которые отвечают современным фармакопейным требованиям. В рамках дальнейшего изучения, важное значение имеет научное обоснование комплексного использования ЛРС дуба черешчатого в медицинской и фармацевтической практике с применением современных методов анализа, а также изучение фармакологического действия растительного сырья представителей рода *Quercus* L.

### Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Рябов, Н. А. Методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого [Текст] / Н. А. Рябов, В. М. Рыжов // **Фармация**. — 2021. — Т. 70, № 2. — С. 24-28. — doi: 10.29296/25419218-2021-02-04.
2. Рябов, Н. А. Научное обоснование рационального использования коры дуба черешчатого в фармацевтической практике [Текст] / Н. А. Рябов, В. М. Рыжов, В. А. Куркин // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. — 2021. — Т. 24, № 6. — С. 20-28. — doi: 10.29296/25877313-2021-06-03.
3. Рябов, Н. А. Антимикробная активность водно-спиртовых извлечений листьев и почек дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) [Текст] / Н. А. Рябов, М. В. Рыжов, В. А. Куркин [и др.] // **Фармация и фармакология**. — 2021. — Т. 9, № 2. — С. 104-113. — doi: 10.19163/2307-9266-2021-9-2-104-113.
4. Рябов, Н. А. Методика количественного определения суммы флавоноидов в почках дуба черешчатого *Quercus robur* L. [Текст] / Н. А. Рябов, В. М. Рыжов, В. А. Куркин // **Фармация и фармакология**. — 2021. — Т. 9, № 5. — С. 356-366. — doi: 10.19163/2307-9266-2021-9-5-356-366.
5. Рябов, Н.А. Исследование антимикробной активности извлечений коры дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) [Текст] / Н.А. Рябов, В.М. Рыжов, В.А. Куркин [и др.] // **Аспирантский вестник Поволжья**. — 2021. — № 5–6. — С. 48–57. — doi: <https://doi.org/10.17816/2072-2354.2021.21.3.48-57>.
6. Рябов, Н. А. Определение антимикробной активности спиртовых извлечений коры и почек дуба черешчатого [Текст] / Н. А. Рябов, В. А. Куркин, В. М. Рыжов [и др.] // **Аспирантский вестник Поволжья**. — 2020. — № 1-2. — С. 152-157. — doi: 10.17816/2072-2354.2020.20.1.152-157.
7. Рябов, Н. А. Сравнительное спектрофотометрическое исследование водно-спиртовых извлечений листьев некоторых представителей рода *Quercus* / Н. А. Рябов, В. М. Рыжов, В. А. Куркин [и др.] [Текст] // 90 лет - от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы: Сборник материалов юбилейной международной научной конференции, Москва, 10–11 июня 2021 года. – Москва: ФГБНУ "ВИЛАР", 2021. — С. 448-453.
8. Рябов, Н. А. Изучение вопросов стандартизации настойки листьев дуба черешчатого [Текст] / Н. А. Рябов // Аспирантские чтения - 2021: молодые ученые - медицине : Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Самара, 13–14 октября 2021 года / Под редакцией А.В. Колсанова и Г.П. Котельникова. – г. Самара: ООО "СамЛюксПринт", 2021. – С. 283-285.
9. Исследование петиолярных признаков листьев дуба черешчатого *Quercus robur* L. / Н. А. Рябов, В. М. Рыжов, В. А. Куркин [и др.] [Текст] // Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы: Сборник материалов, Самара, 26–27 октября 2021 года / Самарский государственный медицинский университет. – Самара: СамГМУ, 2021. – С. 433-444.
10. Рябов, Н. А. Морфолого-анатомическое исследование листовой пластинки дуба летнего фастигиата (*Quercus robur* 'Fastigiata') [Текст] / Н. А. Рябов, В. М. Рыжов, Л. В. Тарасенко [и др.] // Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения: Сборник научных трудов Международной научной конференции, Москва, 17–18 декабря 2020 года. – Москва: ФГБНУ "ВИЛАР", 2020. — С. 260-267. – doi: 10.52101/9785870190921.
11. Рябов, Н. А. Исследование возможностей таксации видов рода *Quercus* по морфологии листа [Текст] / Н. А. Рябов // Аспирантские чтения - 2020. Молодые ученые: научные исследования и инновации: Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 90-летию з.д.н. РФ профессора А.А. Лебедева, Самара, 15 октября 2020 года. – Самара: ООО «СамЛюксПринт», СамГМУ, 2020. — С. 267-270.
12. Рябов, Н. А. Морфолого-анатомическое исследование листьев дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) / Н. А. Рябов, В. М. Рыжов, В. А. Куркин [и др.] [Текст] // От растения до лекарственного

- препарата: Материалы международной научной конференции, Москва, 04–05 июня 2020 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "ВИЛАР", 2020. - С. 270-275.
13. Рябов, Н. А. Спектральное и хроматографическое исследование настоек из почек дуба черешчатого *Quercus robur* L. [Текст] / Н. А. Рябов, В. А. Куркин // Актуальные вопросы современной медицины и фармации: Материалы 72-й научно-практической конференции студентов и молодых ученых, Витебск, 12–13 мая 2020 года / Витебский государственный ордена "Дружбы народов" медицинский университет. – Витебск: ВГМУ, 2020. — С. 794-796.
14. Рябов, Н. А. Люминесцентный анализ листьев дуба черешчатого *Quercus robur* L. [Текст] / Н. А. Рябов, В. М. Рыжов // Современные проблемы фармакогнозии: IV Межвузовская научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 100-летию Самарского государственного медицинского университета. Сборник материалов, Самара, 28 октября 2019 года / Под редакцией В.А. Куркина. – Самара: СамГМУ, 2019. — С. 191-198.
15. Рябов, Н. А. Фармакогностическое исследование дуба черешчатого [Текст] / Н. А. Рябов // Аспирантские чтения-2019: Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию Самарского государственного медицинского университета, Самара, 10 октября 2019 года. – Самара: СамГМУ, 2019. — С. 276-278.
16. Рябов, Н. А. Фармакогностическое исследование дуба черешчатого / Н. А. Рябов // Аспирантские чтения-2019 : Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию СамГМУ, Самара, 10 октября 2019 года. – Самара: СамГМУ, 2019. – С. 276-278.
17. Рябов, Н. А. Изучение стероидных и тритерпеновых соединений коры дуба черешчатого [Текст] / Н. А. Рябов // Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты: сборник материалов, Самара, 11 апреля 2018 года. – Самара: ООО "Офорт", 2018. – С. 342-343.
18. Рябов, Н. А. Анатомио-морфологическое исследование почек дуба черешчатого *Quercus robur* L. [Текст] / Н. А. Рябов, В. М. Рыжов, Л. В. Тарасенко, А. А. Сохина // Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы: Сборник материалов, Самара, 07 октября 2017 года / ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России; Под редакцией В.А. Куркина. – Самара: СамГМУ, 2017. – С. 149-158.

### Патенты

1. Патент № 2751189 С1 Российская Федерация, МПК А61К 31/352, А61К 36/49, В01D 11/02. Способ количественного определения суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого / Рыжов В. М., Рябов Н. А.; заявитель СамГМУ. № 2020133909 : заявл. 14.10.2020 : опубл. 12.07.2021
2. Справка на приоритет изобретения РФ № 2021131121 С1 Российская Федерация, МПК А61К 31/352, А61К 36/49, В01D 11/02. Способ количественного определения суммы флавоноидов в почках дуба черешчатого / Рябов Н. А., В. М. Рыжов, В.А. Куркин; заявитель СамГМУ. – № 2021131121 : заявл. 25.10.2021.
3. Справка на приоритет изобретения РФ № 2021131123 С1 Российская Федерация, МПК А61К 31/352, А61К 36/49, В01D 11/02. Способ получения настойки листьев дуба черешчатого, обладающей антимикробной активностью / Рябов Н. А., Рыжов В. М., Куркин В.А., Колпакова С.Д., Жестков А.В., Лямин А.В; заявитель СамГМУ. – № 2021131123 заявл. 25.10.2021.