

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

РЯБОВ НИКОЛАЙ АНАТОЛЬЕВИЧ

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

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
кандидат фармацевтических наук, доцент
РЫЖОВ ВИТАЛИЙ МИХАЙЛОВИЧ

Самара – 2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. РОД <i>QUERCUS</i> , ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	23
1.1. Данные классификации и этимологии названия дуба черешчатого	23
1.2. Видовое разнообразие и ботаническое описание некоторых представителей рода <i>Quercus</i> L.	24
1.2.1. Дуб черешчатый (<i>Quercus robur</i> L.). Ботаническое описание.....	24
1.2.2. Дуб скальный (<i>Quercus petraea</i> Liebl.). Ботаническое описание	26
1.2.3. Дуба черешчатый пирамидальный – <i>Quercus robur</i> var. <i>fastigiata</i> (Lam.) Spath. Ботаническое описание	27
1.2.4. Дуб Мюлленберга – <i>Quercus Muehlenbergii</i> Engelm. Ботаническое описание.....	27
1.3. Ареал обитания <i>Quercus robur</i> L.....	28
1.4. Актуальные данные химического состава лекарственного растительного сырья <i>Quercus robur</i> L.....	31
1.5. Современные данные о лекарственном растительном сырье дуба черешчатого	35
1.6. Опыт применения дуба черешчатого	36
1.6.1. Практическое общехозяйственное применение дуба черешчатого	36
1.6.2. Применение дуба черешчатого в народной медицине	37
1.6.3. Данные по использованию <i>Quercus robur</i> L. в современной медицинской практике	37
1.7. Данные по стандартизации сырья дуба черешчатого.....	41

1.8. Лекарственные препараты на основе сырья дуба черешчатого и перспективные направления использования их в медицинской практике	43
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	49
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	51
2.1. Характеристика объектов исследования, используемых в процессе написания научно-исследовательской работы.....	51
2.2. Характеристика методов, используемых в процессе написания научно-исследовательской работы	54
2.2.1. Методики микроскопического анализа	54
2.2.2. Физические методы анализа	56
2.2.3. Химические методы анализа	56
2.2.4. Хроматографические методы анализа	57
2.2.5. Физико-химические методы анализа	58
2.2.6. Технологические методы	59
2.2.7. Микробиологические методы анализа	60
2.2.8. Фармакологические методы анализа	62
ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ОРГАНОВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО (<i>QUERCUS ROBUR</i> L.)	63
3.1. Сравнительная морфология листовых пластинок видов рода <i>Quercus</i>	63
3.2. Морфолого-анатомическое исследование листьев дуба черешчатого <i>Quercus robur</i> L.....	65
3.3. Исследование петиолярной анатомии <i>Quercus robur</i> L.	70
3.4. Сравнительная петиолярная анатомия видов рода <i>Quercus</i> L.....	75
3.5. Морфолого-анатомическое исследование почек дуба черешчатого	78
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	83

ГЛАВА 4. ДАННЫЕ ФИТОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИСТЬЕВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО	84
4.1. Выделение индивидуальных веществ из листьев дуба черешчатого	84
4.2. Исследование фракций, содержащих перспективные индивидуальные вещества, выделенные из листьев дуба черешчатого	85
4.3. Установление химической структуры выделенных веществ	88
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	95
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛИСТЬЕВ, МНОГОЛЕТНЕЙ КОРЫ И ПОЧЕК ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО <i>QUERCUS ROBUR</i> L.....	96
5.1. Разработка методик качественного анализа ЛРС дуба черешчатого	96
5.1.1. Анализ водно-спиртовых извлечений листьев представителей рода <i>Quercus</i> L. методом тонкослойной хроматографии	97
5.1.2. Сравнительное спектрофотометрическое исследование водно-спиртовых извлечений листьев некоторых представителей рода <i>Quercus</i> L.....	99
5.1.3. Качественный анализ водно-спиртовых извлечений листьев дуба черешчатого	101
5.1.4. Качественный анализ водно-спиртовых извлечений почек дуба черешчатого	102
5.1.5. Качественный анализ спиртовой настойки листьев дуба черешчатого методом ВЭЖХ	104
5.2. Разработка методик количественного анализа листьев и почек дуба черешчатого	106
5.2.1. Разработка методики количественной оценки суммы флавоноидов в листьях <i>Quercus robur</i> L.	107
5.2.2. Сравнительное количественное определение стероидов в коре дуба черешчатого <i>Quercus robur</i> L.....	123

5.2.3. Научное обоснование рационального использования коры дуба черешчатого в фармацевтической практике.....	126
5.3. Количественное определение БАВ в настойке листьев дуба черешчатого	136
5.4. Изучение процесса биоаккумуляции (динамики накопления) флавоноидов в листьях <i>Quercus robur</i> L.....	139
5.5. Определение нормируемых ГФ РФ числовых показателей перспективного вида ЛРС «Дуба черешчатого листа».....	142
5.6. Определение числовых показателей для перспективного вида ЛРС «Дуба черешчатого почки».....	143
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5	145
ГЛАВА 6. ОБОСНОВАНИЕ ПЕРСПЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО <i>QUERCUS ROBUR</i> L. В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ.....	147
6.1. Сравнительное определение антимикробной активности водно-спиртовых извлечений коры дуба черешчатого	147
6.2. Сравнительное определение антимикробной активности водно-спиртовых извлечений листьев и почек дуба черешчатого	152
6.3. Изучение диуретической активности диагностически значимого вещества листьев дуба черешчатого – астрагалина	157
6.4. Изучение острой токсичности спиртовой настойки листьев дуба черешчатого	158
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6	160
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	161
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	164
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	185

Приложение 1. Акты о внедрении результатов диссертационного исследования.....	185
Приложение 2. Патенты по теме диссертационного исследования.....	193
Приложение 3. Гербарные образцы изучаемых видов листьев рода <i>Quercus</i> ..	196
Приложение 4. Фитохимическое исследование листьев перспективных видов рода <i>Quercus</i>	199
Приложение 5. Изучение антимикробной активности водно-спиртовых извлечений и препаратов на основе коры, листьев и почек дуба черешчатого. ..	200
Приложение 6. Проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Дуба черешчатого листа».....	203
Приложение 7. Проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Дуба черешчатого почки».....	211

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. В структуре приоритетных направлений современной отечественной фармации значимыми являются задачи, связанные с расширением перечня качественных, эффективных и безопасных лекарственных средств, 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 данный момент 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; Пупыкина К.А., Кудашкина Н.В., 2009; Киселева Т.Л., 2010; Бубенчикова В.Н. и др. 2013; Куркин В.А., 2019). 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* Engelm.

Дуб черешчатый входит в Государственную фармакопею Российской Федерации (ГФ РФ) и в фармакопеи ряда зарубежных стран. Кора дуба черешчатого обладает ценными фармакологическими свойствами, такими как противовоспалительное и вяжущее. Фармакологические свойства данного растения связаны с особенностями химического состава, который представлен широким спектром биологически активных веществ (БАВ), в частности веществами фенольной природы, такие 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, 1963b).

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 (липофильных экстрактов) 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 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. На данное время, 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 (Круговоручко, 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 полноценно отображают имеющийся на сегодня профиль БАВ, содержащихся в коре дуба черешчатого (Платонов В.В. и др., 2020 г.).

Вопросом усовершенствования 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.; Рябикина 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 «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. Не решенным 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. В этой связи учеными были получены данные о наличии антиоксидантной, антимикробной, антитопоизомеразной и антипролиферативной активности для листьев некоторых видов: *Q. resinosa*, *Q. laeta*, *Q. grisea* и *Q. s obtusata*, среди которых вид *Q. resinosa* представлял 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 многолетняя 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 биологически активных веществ листьев дуба черешчатого.
3. Разработка 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. 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 биологически активных веществ 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- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона и моносахарид рамноза, впервые в РФ выделены вещества астрагалин (3-О- β -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- 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 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона), и 3-О- β -D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона, химическая структура которых установлена с применением методов УФ-спектрофотометрии, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии.

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, значения которых для листьев дуба черешчатого варьирует от 0,31 % до 1,63 % при значении рабочей длине волны 412 нм в пересчете на стандартный образец (СО) рутин, для почек дуба черешчатого варьирует от 0,27 % до 0,44 % в пересчете на СО цинарозид при рабочей длине 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 чего 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). В ходе

исследования доказано наличие выраженной антимикробной активности водно-спиртовых извлечений и настоек листьев, почек и коры в отношении всех вышеперечисленных штаммов. По итогам работы также 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 использования 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 (PCO), также определен его удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%} = 300$) и рассчитано значение величины R_{st} (1,22), что может быть использовано для качественной и количественной оценки данного вещества в листьях дуба черешчатого (при наличии PCO астрагалина). Помимо астрагалина впервые из листьев дуба черешчатого выделены вещества 3-O- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона моносахарид рамноза, а также флавоноиды изковерцитрин, кверцитрин, афзелин и 3-O- β -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 листьев и почек дуба черешчатого, а также экстракционного препарата «Дуба черешчатого листьев настойка» методами тонкослойной хроматографии, ВЭЖХ и дифференциальной УФ-спектрофотометрии. По итогам разработки методики количественного анализа суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого предложено использовать СО рутин при значении аналитической длины волны 412 нм. Подтверждена возможность использования вещества астрагалина для анализа содержания флавоноидов в листьях дуба черешчатого при длине волны 406 ± 2 нм. Для количественного анализа суммы флавоноидов в почках дуба черешчатого предложено использовать стандартный образец цинарозиды при значении рабочей длины волны 400 ± 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).

Получены данные о наличии 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 1,63 % (не менее 0,30 %), для проекта ФС на новый вид ЛРС «Дуба черешчатого листа» для включения в ГФ РФ.

По итогам проведенной работы были получены 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 фармакогностическое исследование выполнялось с применением методов микроскопии (световой и люминесцентной), тонкослойной хроматографии (ТСХ), УФ-, 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 листа».

Степень достоверности. Достоверность диссертационного исследования подтверждена данными, полученными в процессе проведения экспериментов с использованием световой и люминесцентной микроскопии, тонкослойной хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, 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 на изобретения 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 процессах 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 их диагностически значимые признаки и проведен их люминесцентный анализ. Выполнено сравнительное исследование петиолярной анатомии листьев некоторыми представителями рода *Quercus*: дуба скального,

дуба летнего, фастигиата, дуба Мюлленберга. Выявлены диагностические признаки листьев дуба черешчатого, которые заключаются в специфике строения поперечных сечений черешковой части листа, характере опушения листа, наличии кристаллических включений (друз) в поперечных срезах листа, а также в специфике строения проводящей системы листа. Определены особенности люминесценции тканей листьев и почек дуба, а также объяснена связь люминесценции с содержанием 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- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона и рамноза выделены впервые для листьев дуба черешчатого, а флавоноиды астрагалин, изковерцитрин, кверцитрин, афзелин и 3-О- β -D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона выделены впервые из листьев дуба черешчатого в РФ.

Также автором разработаны методики качественного и количественного анализа флавоноидов в листьях, почках и коре дуба черешчатого. Также 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 ЛП «Дуба черешчатого листьев настойка».

Разработаны числовые показатели нового вида ЛРС «Дуба черешчатого листья», которые включены в проект ФС Государственной Фармакопеи Российской Федерации.

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 литературных источников отечественных и иностранных авторов в области фармакогностических исследований дуба черешчатого (*Quercus robur* L.). В главе подробно описаны данные, касающиеся ареала, химического состава, подходов к стандартизации коры дуба черешчатого. Актуальные данные по стандартизации сырья, методам качественного и количественного анализа. Также описаны данные о химическом составе изучаемого вида, о фармакологических свойствах сырья и препаратов на основе официальных видов сырья, о применении в народной и официальной медицине.

Глава 2 включает описание объектов и методов исследования.

Глава 3 посвящена результатам исследования по микроскопии листьев и почек дуба черешчатого с использованием люминесцентного метода. Также в данной 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. Также 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.

ГЛАВА 1. РОД *QUERCUS*, ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ФАРМАЦЕВТИЧЕСКОЙ ПРАКТИКЕ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

В целях объективной оценки имеющихся современных данных по применению дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) в мировой фармацевтической практике необходимо проведение обзора имеющихся на данный момент актуальных сведений по изучаемому объекту. Дуб черешчатый на протяжении мировой истории достаточно широко использовался как в народной медицинской практике, так и в научной медицине РФ и зарубежных стран.

1.1. Данные классификации и этимологии названия дуба черешчатого

Дуб черешчатый (дуб обыкновенный, дуб английский, дуб летний) – *Quercus robur* L. (*Q. pedunculata* Ehrh.); *Quercus fructipendula*, *Quercus germanica* Lasch.), семейство Буковые – *Fagaceae*, подсемейство *Quercoideae*, род *Quercus* L. [1, 20, 50, 59, 60, 67, 88, 106, 120, 132].

В семействе Буковые (*Fagaceae*) по разным источникам насчитывается 3 основных рода (всего 8 родов) и более 600 видов, которые растут в основном в умеренной зоне северной части [1, 50, 59, 60, 106]. Согласно имеющимся данным, на территории РФ в условиях естественного климата произрастают около 15 видов дуба. В РФ интродуцировано около 50 видов, произрастающие в западных и южных регионах [1, 21, 50, 59, 60].

По некоторым данным, название рода *Quercus*, по всей видимости, происходит от образования кельтских слов – «*quer*», которое означает «красивый» или «красный» и «*сuez*», означающего слово «дерево», то образует словосочетание «красное, красивое дерево» [50]. Имеется мнение, о происхождении родового названия греческого глагола *keerkein*, в значении быть шершавым или шероховатым, что характерно для свойств коры [50]. Слово, обозначающее видовую принадлежность данного растения – «*robur*» характерно для деревьев с твердой корой. Другой вариант обозначения видовой принадлежности «*pedunculata*» или «черешчатый» связано с особенностью плодов растения, а

именно наличием у желудей длинной ножки, прикрепленной к чашечке желудя [50].

1.2. Видовое разнообразие и ботаническое описание некоторых представителей рода *Quercus* L.

Основными представителями рода *Quercus*, которые представляют наибольший интерес для изучения, являются следующие виды: 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, дуб Мюлленберга - *Quercus Muehlenbergii* Engelman.

В настоящей главе приводится описание тех видов рода *Quercus*, которые имеют наибольший ареал произрастания и культивируются на территории Российской Федерации, в том числе в Самарской области.

1.2.1. Дуб черешчатый (*Quercus robur* L.). Ботаническое описание

Дуб Черешчатый, дуб обыкновенный или дуб летний – *Quercus robur* L. (*Q. Pedunculata* Ehrh.) – мощное дерево достигающее 35-40 м в высоту и более 1-1,5 м в ширину ствола [1, 12, 50, 60]. Дуб достаточно долголетнее растение – до 400-500 лет, редко и до 1000 лет [1, 50]. Крона дуба шатровидная, достаточно широкая, опускающаяся к низу дерева. Стволовая часть дерева дуба зачастую прямая, но на молодых стволах деревьев могут присутствовать колена либо изгибы [1, 59, 60, 68, 70, 105, 129] (рис. 1).

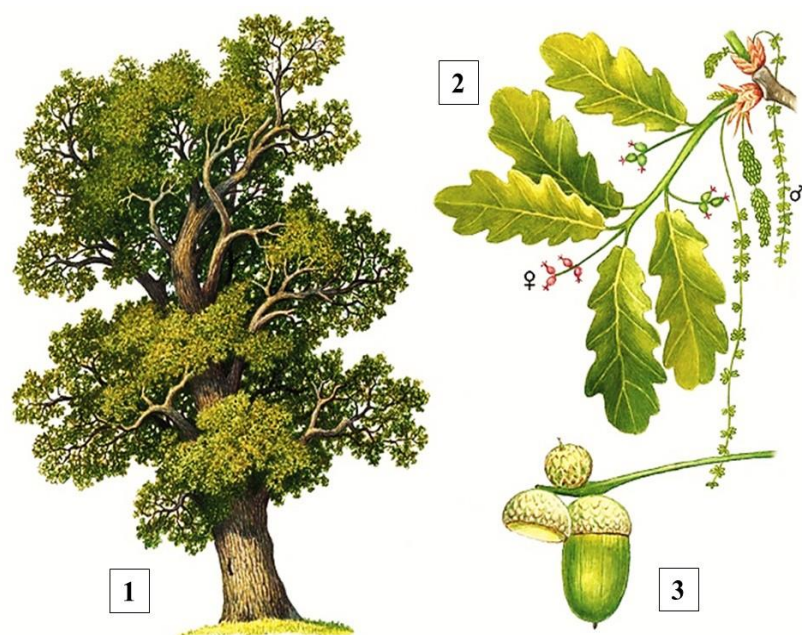


Рисунок 1 – Дуб черешчатый (*Quercus robur* L.): Обозначения: 1 – общий вид; 2 – цветущая ветвь с женскими (♀) и мужскими (♂) цветками; 3 – жёлудь с черешком [134]

Цвет коры молодых веток дуба варьирует от зеленого до бурого или красно-бурого. Кора дуба блестящая, гладкая, с возрастом постепенно начинает растрескиваться, кора старых деревьев – достаточно толстая, цвет варьирует от бурого до серого, имеет широкие трещины по ходу стволовой части [1, 129].

Листья дуба черешчатого морфологически простые, широкие, обратнояйцевидные, перисто-лопастные, по структуре плотные, кожистые. Цвет листьев как правило сверху листа темно-зеленый. Размер листовых пластинок варьирует в длину от 7 до 15 см (иногда до 30 см), в ширину составляет от 4 см до 7 см [1, 12, 24, 50, 70, 95, 129]. Отмечает наличие на верхней части листа выемки, у основания листья имеют сердцевидную форму, также присутствуют хорошо выделяющиеся ушки, которые постепенно переходят в черешок (длина черешка 0,5-1 см). У листа имеются лопасти, которые разноразмерные и расположены парами в числе 4-6 (8), имеющие тупую форму, с целыми ровными краями (иногда имеются зубцы). В длину листья достигают в среднем 7-15 см, а в ширину до 4-7 см. Расположение почек и листьев на побегах очередное, однако на верхней части побегов листья могут располагаться в виде пучков. Листья дуба распускаются

весной (часто в середине-конце мая), в октябре опадают, приобретая при этом бурый или красно-бурый цвет [1, 12, 24, 50, 70, 95].

Почки дуба овальные, к верхней части слегка заостренные, структура поверхности чешуй черепитчатая [1].

Цветки дуба черешчатого сидячие, в количестве цветков на цветоносе равным 1 или 5, размеры которых варьируют от 4 до 8 см, раздельнополые. Мужские цветки (тычинки) сформированы в длинные свисающие сережки (в количестве от 2 до 4) желто-зеленого цвета. Структура околоцветника представлена в виде разделенных линейно-ланцетовидных долей (от 5 до 9). Женские цветки (пестичные) представлены околоцветником с 6 клетками и пестиками пурпурового цвета [1].

Односемянные желуди (плоды) дуба удлинено-яйцевидные длиной 1,5-2,5 см, светло-коричневые или буроватые, гладкие, блестящие, помещаются в неглубокой, блюдцевидной плюске, чашевидной, с притупленными опушенными чешуями (рис. 1) [1, 11, 12, 15, 24, 50, 58, 59, 60, 65, 67, 75, 88, 90, 95, 105, 106]. Структура желудя представлена двумя большими семядолями (зародыш и плотная деревянистая оболочка околоплодника коричневого цвета. Плоды созревают к началу осени [1].

Молодые побеги дуба черешчатого сероватые или красновато-бурых оттенков со светлыми чечевичками [1, 60, 68, 70, 105].

1.2.2. Дуб скальный (*Quercus petraea* Liebl.). Ботаническое описание

Дуб скальный – (*Quercus petraea* (Mattuschka) Liebl., или *Quercus sessiliflora*) описывается разными авторами как высокое дерево, достигающее в высоту до 20-40 м с широким, ровным стволом (до и более 1 м), с тонкой корой светло-серого цвета с хорошо заметными мелкими трещинами. Для почек дуба скального характерно острая форма. Листовые пластинки достигают в длину 8-10 см, имеют достаточно длинные черешки, на листьях присутствуют глубокие лопасти, которые расположены по парам (по 5-9). Цвет верхней части листьев темно-зеленый или зеленый, на нижней части листовой пластинки присутствуют звездчатые волоски.

Женские цветки аналогичны цветкам дуба черешчатого [1]. Период вегетации дуба скального позже относительно дуба черешчатого и часто остается на зиму с листьями, которые не опадают. Цвет и структура плодов (желудей) аналогична дубу черешчатому. Дуб скальный произрастает в средней полосе (юго-западная часть) [60, 65, 119, 129].

Дуб скальный достаточно требователен к условиям климата и места обитания. Дуб скальный в хозяйственном значении не уступает дубу черешчатому, имеет мягкую древесину [1, 129]. Представленный вид может образовывать гибридные формы с дубом черешчатым, морфологически которые могут сильно отличаться между собой [1, 129].

1.2.3. Дуба черешчатый пирамидальный – *Quercus robur* var. *fastigiata* (Lam.) Spach. Ботаническое описание

Дуб черешчатый пирамидальный – *Quercus robur* var. *fastigiata* (Lam.) Spach. – это декоративное растение с пирамидальной кроной, является культурной разновидностью дуба черешчатого, зачастую применяемым при озеленении южных и западных регионах [1, 59, 60, 144].

Листья дуба *Quercus robur* var. *fastigiata* (Lam.) Spach напоминают листья дуба черешчатого и внешне достаточно схожи: листовые пластинки продолговато-обратнояйцевидные, простые, перисто-лопастные, по структуре плотные, кожистые; цвет листа сверху темно-зеленый, опушение отсутствует, размеры листа: от 7 до 15 см в длину; от 4 до 7 см в ширину. Листья дуба скального имеют несколько пар разноразмерными лопастями, в количестве 4-6, с округлой верхушкой и с зауженным основанием [144]. Черешок листа дуба фастигиата в длину около 1,5 см. Период вегетации схожий с дубом черешчатым и приходится на период май-сентябрь (октябрь) [144].

1.2.4. Дуб Мюлленберга – *Quercus Muehlenbergii* Engelm. Ботаническое описание

Дуб Мюлленберга – *Quercus Muuhlenbergii* (*Quercus acuminata*) Engelm. (Дуб Чинкапина) – крупное и умеренно растущее дерево, достигающее в высоту 18-24 м [147]. Данный вид широко распространен по всей территории США и в некоторых частях Канады и Мексики. Научное название было присвоено Готтильфом Генрихом Эрнстом Мюленбергом (1753-1815), лютеранским священником и ботаником-любителем из Пенсильвании. Поскольку его название может быть написано «*Mühlenberg*» с умлаутом над «и», это имя обычно транскрибируется *Muehlenbergii*. Однако Флора Северной Америки использует написание *Muhlenbergii* [147]. Дуб Чинкапина обычно используется в качестве пиломатериала и широко применяется для изготовления шкафов, мебели, поддонов и контейнеров [147].

Данный вид начинает цвести с апреля до конца мая или начала июня. Тычиночные цветки растут в сережках, которые развиваются из пазух листьев прошлого года, а пестичные цветы развиваются из пазух листьев текущего года. Плоды, желудь или орех вырастают поодиночке или парами, созревают за 1 год и созревают в сентябре или октябре. Около половины желудя заключено в тонкую чашку и имеет цвет от каштаново-коричневого до почти черного. Характеристики листьев *Quercus Muehlenbergii* включают: основание листа округлое; жилки и пазухи правильные; листья с острыми зубцами, без опушения. с крупными зубьями, в длину (от 5 до 15 см) и в ширину (от 4 до 8 см). Желуди без стеблей или с короткими стеблями длиной менее 8 мм. Осенью желуди становятся коричневыми и сладкими на вкус. Дуб Мюлленберга очень легко приспосабливается к окружающей среде, его ареал широко распространен по всей территории США [147].

1.3. Ареал обитания *Quercus robur* L.

Дуб черешчатый – представитель группы основных древесных пород в зоне смешанных и широколиственных лесов европейской части стран СНГ [1]. В Сибири дуб практически не произрастает, встречается в лесных зонах на Дальнем Востоке, а также на Кавказе и в Крыму [1, 27, 38, 50, 70, 105, 129]. На территории

РФ дуб черешчатый представлен широким ареалом, находящимся в зоне умеренного климата, северная граница которого проходит от побережья Финского залива, огибает с юга Ладожское озеро простирается к Уралу, по ходу Волги спускается к Волгограду и через низовья Дона и Днепра уходит за пределы страны [1] (рис. 2).



Рисунок 2 – Регионы распространения дуба черешчатого на территории России.

 – ареал обитания дуба черешчатого [55]

Дуб черешчатый произрастает европейской части РФ и Западной Европы, где образует широколиственные леса, в северной части РФ – встречается как примесь к лиственным лесам. Данный вид достаточно сильно варьирует по всем признакам, особенно изменчивы листья, по размерам, форме, степени рассеченности. Дуб черешчатый представлен в виде двух фенологических разновидностей, которые практически морфологически неразличимы: *var. tardiflora* Czern., называется зимним дубом, листья остаются облиственными на зиму, начинают расти и распускаться на 2-3 недели позже чем ранняя его разновидность – *var. praesox* Czern. [1]. Исходя из данных государственного лесного реестра (данные 2021 года) в Самарской области на дуб черешчатый относительно других пород деревьев приходится довольно высокий процент – 25% [30, 72] (рис. 3).

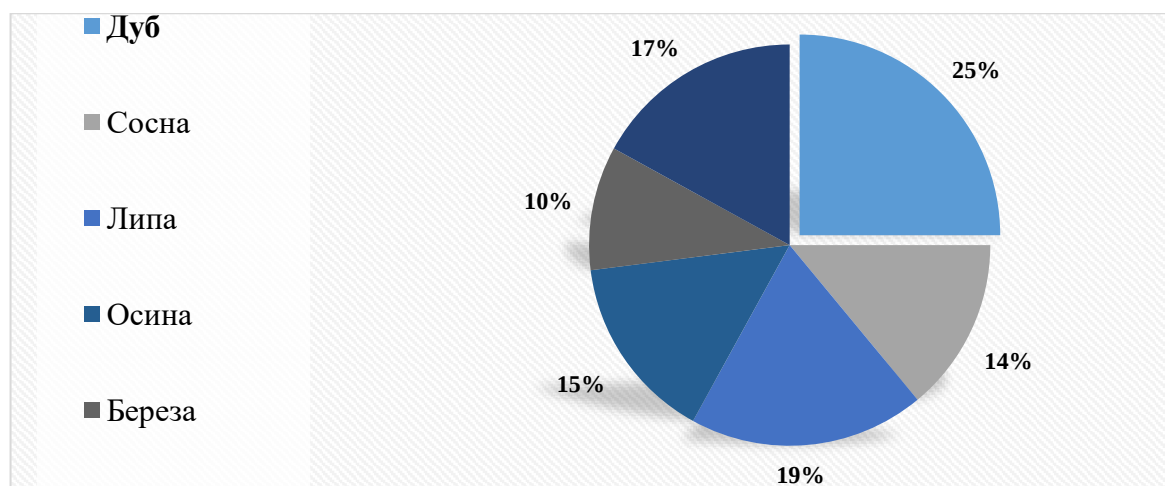


Рисунок 3 – Диаграмма природного состава Самарской области (источник: государственный лесной реестр, актуальность - 01.01.2021) [30, 72]

Близким родом дуба черешчатого можно назвать *Quercus petraea* L. ex Liebl. – дуб скальный, который отличается от дуба черешчатого почти сидячими желудями. В городских садах, парках и вдоль улиц иногда высаживают *Quercus rubra* L. – дуб красный, родом с востока Северной Америки. Листья у него с острыми лопастями, осенью малиновые или лилово-красные; желуди сидячие [59, 60, 114, 129].

Дуб черешчатый произрастает в сообществе со многими основными древесными породами, а также образует дубравы. В границах описываемого ареала дуб черешчатый произрастает на влажных почвах [1].

Значительное разнообразие видов дуба имеется на Кавказе, причем из них пока исследованы немногие. Некоторые виды образуют обширные дубовые леса на Северном Кавказе и особенно в Закавказье [1, 59, 60, 105].

В южной части степной и лесостепной зоне дуб черешчатый образует сплошные леса, иногда растет в качестве примеси к лиственным лесам вдоль рек. Практически не произрастает или же крайне редко произрастает в самых дальних точках северной части [1, 59, 60, 105, 129]. Растение дуб черешчатый является довольно требовательным к плодородию почв, используется при создании защитных полос [1].

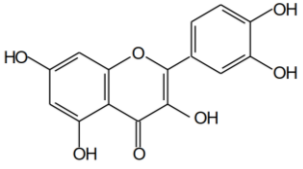
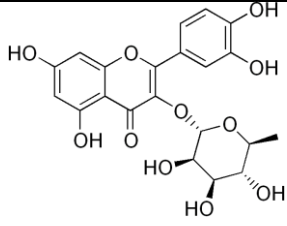
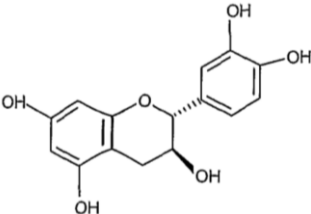
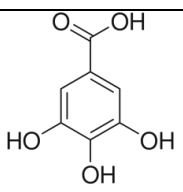
1.4. Актуальные данные химического состава лекарственного растительного сырья *Quercus robur* L.

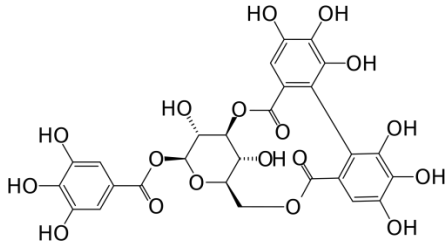
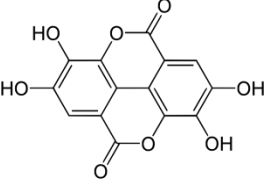
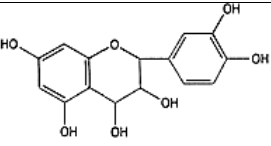
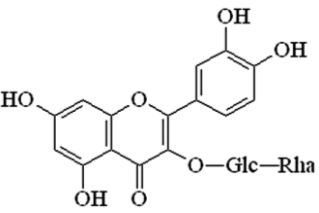
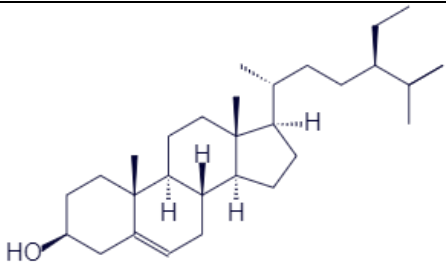
Официальным лекарственным растительным сырьем дуба черешчатого Европейской, Британской фармакопеи, а также Российской фармакопеи является кора [20, 120, 132]. Химический состав коры дуба черешчатого достаточно разнообразен, в большей степени представлен широким спектром веществ фенольной природы. В частности, доминирующая группа БАВ в коре молодых деревьев представленная в виде конденсированных дубильных веществ (ДВ) (7-20 %), образовавшихся в результате окислительной полимеризации катехинов [10, 114, 130, 156]. Катехин и галлокатехин образуют сложные эфиры галловой кислоты (катехин-3-галлаты, эпигаллокатехин-3-галлат) [10, 50, 114, 130]. В коре также присутствуют галловая и эллаговая кислоты. Второй преобладающей группой БАВ помимо дубильных веществ являются флавоноиды [10, 50, 114, 130]. В листьях дуба черешчатого содержится до 0,6 % флавоноидов, в ветвях – до 1,2 % флавоноидов, среди которых кверцетин, кверцитрин, 3-глюкозид и 3-рамнозид кемпферола, 3-глюкозид изорамнетина, рутин и кемпферол [10, 50, 114, 130]. Также в коре присутствуют также стерины – ситостерин, терпены (фриделин, фриделинол, 3-фриделанол) [10]. Желуди дуба черешчатого содержат крахмал (до 40 %), дубильные вещества (5-8 %), белки, аминсахара, жирное масло (до 5 %), углеводы [10].

В коре дуба присутствуют олигомерные проантоцианидины эллагитанины: (касталагин, педункулагин, весвалагин, 2,3-(S)-гексагидроксидифеноил глюкозу), флавано-эллагитанины (акутиссимины А и В, эвгениграндин, гуаявагин В, стенофиллантин В) галлотанины мономерные и димерные катехины и лейкоцианидины танины (от 12 до 16 %) [10, 114]. Кора дуба содержит как гидролизуемые, так и конденсированные дубильные вещества [10, 114]. Содержание танина зависит от времени сбора урожая, возраста ветвей и от используемого метода анализа. Основными видами гидролизуемых дубильных веществ являются галлотанины и элагитанины [10, 114]. Конденсированные

дубильные вещества не очень стабильны; они могут окисляться в растворимые флобафены (нерастворимые в воде фенольные соединения), которые больше не обладают дубильными свойствами. Также в коре присутствуют нерастворимые полиэферы липидов (суберины); летучие кислоты (уксусная и муравьиная) [10, 114]. В таблице 1 представлены основные компоненты химического состава коры дуба черешчатого.

Таблица 1 – Основные компоненты химического состава коры дуба черешчатого

№ п/п	Соединение	Структурная формула	Источники литературы
1.	Кверцетин ($C_{15}H_{10}O_7$)		[10, 50, 51, 114, 130]
2.	Кверцитрин ($C_{21}H_{20}O_{11}$)		[10, 50, 51, 114, 130]
3.	Катехин ($C_{15}H_{14}O_6$)		[10, 36, 50, 51, 114, 130]
4.	Галловая кислота ($C_7H_6O_5$)		[10, 36, 50, 51, 50, 51, 114, 130]

5.	Галлотанин ($C_{76}H_{52}O_{46}$)		[10, 36, 50, 51, 50, 51, 114, 130, 135]
6.	Эллаговая кислота ($C_{14}H_6O_8$)		[10, 36, 50, 51, 50, 51, 114, 130]
7.	Лейкоантоциан идин ($C_{15}H_{14}O_3$)		[10, 50, 51, 50, 51, 114, 130]
8.	Рутин ($C_{27}H_{30}O_{16}$)		[10, 50, 51, 50, 51, 114, 130]
10.	Ситостерин ($C_{29}H_{50}O$)		[10]

Учеными ФГБУ Национального медицинского исследовательского центра акушерства, гинекологии и перинатологии им. В.И. Кулакова совместно с учеными Тульского государственного университета было выполнено хромато-масс-спектрометрическое исследование химического состава гексанового, толуольного, ацетонового, этанольного и хлороформного экстрактов коры дуба черешчатого [78, 79, 99]. В составе последнего идентифицировано 60 соединений, для которых

установлены структурные формулы, количественное содержание, рассчитан структурно-групповой состав экстракта, отличающимся высоким содержанием стерина, фенолов, спиртов [78, 79, 99].

Была проведена исследовательская работа учеными из Пятигорского медико-фармацевтического института, в ходе которого было подтверждено наличие флавоноидов в листьях дуба черешчатого, а также подтверждена возможность экстрагирования флавоноидов водными и спиртовыми экстрагентами [56]. Методом ТСХ в водных водно-спиртовых извлечениях листьев дуба обыкновенного было подтверждено наличие веществ рутина, кверцетина и галловой кислоты [56], что говорит о перспективности дальнейшего изучения листьев дуба черешчатого и наличия в них ценных БАВ – флавоноидов.

Химический состав листьев дуба черешчатого изучался как отечественными, так и зарубежными учеными. Данные литературы подтверждают, что в листьях дуба черешчатого содержатся флавоноиды 3-глюкозид и 3-рамнозид кемпферола, рутин, гесперидин, апигенин, морин, нарингин, галангин, а также лейкоантоцианидин, лейкодельфинидин [10, 114, 171]. Также зарубежными учеными из листьев дуба черешчатого были выделены и идентифицированы вещества вескалагин, касталагин, педункулагин, проантоцианидин [10].

Кроме коры дуба интерес представляют листья данного растения, химический состав которых по разным данным представлен широкой группой БАВ: в листьях содержатся флавоноиды, среди которых кверцетин, 3-глюкозид и 3-рамнозид кемпферола, 3-глюкозид кверцетина, кверцитрин, 3-глюкозид изорамнетина, рутин, кемпферол. Флавоноиды являются ценными БАВ, поскольку имеют достаточно широкий спектр биологической и фармакологической активности, что является важным при разработке ЛП на основе ЛРС [42, 93, 140]. Также в листьях дубильные вещества (не менее 7 %); флавоноиды – в листьях до 0,6 %, в ветвях – до 1,2 % (кверцетин, кверцитрин, 3-глюкозид и 3-рамнозид кемпферола, 3-глюкозид изорамнетина, рутин, кемпферол) (Basile et al., 2000), а также стерин – ситостерин (Wrzwciono, 1963b) [10, 171].

Отмечается, что вещество астрагалин было обнаружено ранее в надземных частях астрагала серпоплодного (*A. falcatus* Lam.), полыни горькой (*Artemisia absinthium* L.), курчавки кустарниковой (*Atraphaxis frutescens* L.), в листьях солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и листьях лабазника вязолистного (*Filipendula ulmaria* (L.) Maxim.) [14, 43, 85, 125, 145, 28]. Вещество астрагалин ранее не было описано отечественными зарубежными авторами для листьев дуба черешчатого (*Quercus robur* L.). Однако, учеными Юго-восточного медико-химического института (Пусан, Корея) было установлено наличие производных вещества астрагалина (астрагалин 6"-галлат) в следующих видах рода *Quercus*: *Quercus mongolica*, *Q. dentata*, *Q. acutissima*, *Q. aliena*, *Q. serrata*, и *Q. variabilis*. Наличие производных астрагалина в листьях данных видов подтверждено качественно и количественно при помощи метода ВЭЖХ и обнаружено, что данное вещество обладает эффективностью в отношении болезни Альцгеймера [155]. Установлено также, что вещество астрагалин является достаточно ценным БАВ, обладающим противоопухолевой активностью, ингибирующем передачу сигналов PI3K/AKT при раке желудка [170]. Также, доказано использование вещества астрагалина в качестве противогрибкового средства против инфекций, вызванные *Candida albicans* [150, 145].

Представленные данные химического состава листьев дуба черешчатого говорят о перспективности и актуальности последующего углубленного изучения химического состава листьев дуба черешчатого.

1.5. Современные данные о лекарственном растительном сырье дуба черешчатого

Фармакопейным лекарственным растительным сырьем дуба черешчатого в РФ и ряда зарубежных фармакопей является кора [20, 50, 120, 132]. Такие морфологические органы дуба, как почки, листья, многолетняя стволовая кора не находят своего применения в мировой медицинской практике [1, 20, 50, 114, 120, 132].

Кора дуба описывается в нескольких известных справочниках (Мадаус, 1938 г.), (Мартиндейл, 2007 г.), монографии «Немецкая комиссия Е» и Европейской фармакопеи [132]. В Европейской и Британской фармакопеях кора дуба черешчатого описывается как срезанная и высушенная кора молодых ветвей и боковых побегов *Quercus robur*, *Quercus petraea* и / или *Quercus pubescens*. В соответствие с данными требованиями содержание дубильных веществ должно быть не менее 3 % [120, 132].

Наряду с корой дуба перспективным объектом также являются листья дуба черешчатого и некоторых представителей рода *Quercus*, что подтверждается многочисленными исследованиями зарубежных и отечественных ученых [6, 56, 57, 68, 109, 116, 119, 121, 123, 131, 136, 138, 149, 166, 172].

1.6. Опыт применения дуба черешчатого

Дуб черешчатый (*Quercus robur* L.) является одной из важнейших лесообразующих пород России и используется в различных областях хозяйства [38, 70]. Применение дуба довольно разнообразно. От использования в деревоперерабатывающей промышленности и лесоразведения до применения в медицинской практики и косметологии [38, 59, 60, 65, 70].

1.6.1. Практическое общехозяйственное применение дуба черешчатого

Дуб черешчатый широко используется в области хозяйственного применения [59, 60, 70]. Древесина дуба используется при производстве строительных материалов [59, 60, 70]. Дуб является ценным растением, используемым в пчеловодстве при сборе перги [59, 60, 70].

Дубовая кора традиционно использовалась в качестве дубильного материала в Европе со средневековых времен. Для коммерческих целей используют древесину и кору *Quercus pedunculata* Ehrh. и *Quercus sessiflora* Salisb [59, 60, 70]. Большое значение придается дубам, поскольку применяются при создании

полезных лесных полос, при лесоразведении и лесовосстановлении [59, 60, 70].

Кора содержит дубильные вещества и употребляется для дубления кож. Для древесины характерны высокие технические свойства, что очень ценится в области строительства; используется также в качестве топлива; «мореный» дуб, добываемый у берегов рек, ценится в большей степени [59, 60, 70].

1.6.2. Применение дуба черешчатого в народной медицине

В народной медицине используют кору дуба черешчатого. Отвар коры назначают внутрь при нарушениях работы желудочно-кишечного тракта (при язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки, диарее, гастритах), используется также при кровотечениях из органов ЖКТ (при геморроях, полименорее); Кора дуба черешчатого может быть использована в качестве антидота при отравлениях солями металлов (медью) и при отравлениях, вызванных употреблением ядовитых грибов. Классически используется отвар коры, который применяется по схеме 15-30 мл 3-4 раза в день; при заболеваниях ЖКТ – по 100 мл 2-3 раза в день [38, 50, 71, 74, 108]. Находит свое применение кора дуба и в ветеринарной практике [71, 74, 108].

Помимо использования отвара коры, в народной медицине также используются: сок из листьев дуба (собранные в начале вегетационного периода), сок из желудей дуба (из свежих плодов) [71, 74, 108]

1.6.3. Данные по использованию *Quercus robur* L. в современной медицинской практике

Помимо хозяйственной деятельности человека, дуб черешчатый находит применение в медицине в качестве лекарственного растительного сырья с вяжущими и противовоспалительными свойствами [10, 24, 36, 38, 48, 50, 69, 114].

По данным зарубежных источников, кора дуба обладает антиоксидантной, антимикробной и противоопухолевой активностью [1, 10, 113, 114, 126, 129, 130, 160]. Кора дуба является источником ценных БАВ (флавоноиды, дубильные вещества, стерины) [1, 10, 113, 114, 126, 129, 130, 160].

Официальной лекарственной формой для лекарственного растительного сырья (ЛРС) коры дуба является отвар, так как вода позволяет извлекать сумму дубильных веществ из сырья, обеспечивающих фармакологические свойства, такие как вяжущие, противовоспалительные, кровоостанавливающие, антимикробные эффекты [50, 114, 116, 126, 129, 130, 160]. Отвар коры дуба рекомендуется применять наружно в качестве полоскания при стоматитах, гингивитах. Отвар коры применяется в качестве примочек при ожогах. Прием отвара коры дуба внутрь в больших количествах приводит к возникновению рвоты, поэтому извлечения коры дуба и вытяжки из нее применяется обычно в качестве наружного средства (компрессы, припарки, спринцевания, ванны). Также, отвар коры дуба обладает сильным дезодорирующим действием, благодаря чему находит свое применение в стоматологической практике. Кора дуба черешчатого входит в ряд важных сборов [50, 67].

В соответствии с Государственным Реестром РФ кора дуба черешчатого – средство растительного происхождения, оказывает вяжущее и противовоспалительное [23]. Помимо официальных свойств, кора дуба используется также как гемостатическое местное средство, рвотное и антисептическое средство, за счет снижения потоотделение путем связывания двухвалентных катионов. Применяется также кора дуба при инфицированных ранах, пролежнях, мозолях, гипергидрозах стоп [38, 50].

Для коры дуба существует ряд свойств с недоказанным действием: используется как тонизирующее средство для желудка. Препарат применяется наружно при воспалительных заболеваниях кожи, воспалении рта и горла, а также половых органов, гнойной экземе, гипергидрозе, при опрелостях в качестве адыювантного лечения детей [38, 50, 114].

Основываясь на зарубежном опыте и на приведенных выше сведениях, можно охарактеризовать основные фармакологические свойства коры дуба черешчатого: антибактериальные, противовоспалительное, противоопухолевое, противовирусное, вяжущее, рвотное средство, отхаркивающее средство, иммуностимулирующее, литолитическое, глистогонное средство [10, 38, 50].

На основании анализа источников литературы и полученных экспериментальных данных можно говорить об уже имеющихся фармакологических свойствах коры, листьев и почек дуба черешчатого. Отвар коры дуба обладает вяжущей и противовоспалительной активностью [20]. Для экстракта коры обнаружено также и антиоксидантное и противовирусное действие [10, 97, 113, 114, 115]. Обнаружено также цитотоксическое действие на клетках линии Li₂₁₀ (лейкемия), характерное для метанольного экстракта коры [139]. Настойка листьев дуба черешчатого обладает гипогликемическим действием, а также гипохолестеринемическими и антиатеросклеротическими свойствами [10]. Водно-спиртовой экстракт листьев аналогично коре дуба проявляют антибактериальную активность за счет наличия в экстракте кверцетина, рутина и атегинина коры [10].

Распространение антимикробной резистентности представляет собой серьезную опасность, которая заключается в снижении эффективности мероприятий по профилактике и лечению инфекционных заболеваний. За последнее время было проведено не мало исследований, посвященных изучению антимикробных свойств коры дуба и экстракционных препаратов [161, 164].

Было проведено исследование по изучению профиля полифенолов в экстрактах, полученных из коры *Q. robur*, *Q. macrocarpa* и *Q. Acutissima*, в результате которого была выявлена антиоксидантная, антибактериальная, противогрибковая и противоопухолевая активность. *Q. robur* проявлял значительную антимикробную активность против *Pseudomonas aeruginosa* по сравнению с экстрактами других видов [128, 130].

Ранее в целях поиска новых антибактериальных средств было проведено исследование вида *Quercus incana*, в ходе которого было выделено два вещества: 4-гидроксидекановая кислота и 4-гидрокси-3-(гидроксиметил) пентановая кислота.

Выделенные соединения были протестированы на наличие противогрибковой активности против *Aspergillus niger* и *Aspergillus favus*. Антибактериальную активность выделенных соединений определяли методом диффузии в лунки агара. Соединение 4-гидроксидекановая кислота было проявляло большую антимикробную активность против *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* и *Micrococcus luteus* (грамположительные). Полученные соединения проявляли антибактериальную активность против *Staphylococcus aureus* с зоной подавления 16 мм и 13 мм. Соединение 4-гидрокси-3- (гидроксиметил) пентановая кислота было умеренно активным в отношении *Bacillus subtilis* и *Micrococcus luteus* с зоной подавления 5 мм и 9 мм. Оба соединения были неактивны в отношении *Escherichia coli* и *Shigella flexneri* [165].

Проводилось исследование по определению антимикробной активности метанольного экстракта коры *Quercus robur* (раствор 80 % метанола в воде), который тестировали методом диффузии в агаре на штаммы *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes* и *Candida albicans* [117]. В результате исследования была определена возможность использования экстрактов коры дуба в качестве бактерицидного средства в отношении штаммов *Staphylococcus aureus* и бактериостатического средства в отношении *Enterobacter aerogenes* [117]. Липофильные экстракты проявляли активность против штаммов *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter aerogenes* и *Candida albicans* [117].

Одним из серьезных факторов при успешном лечении инфекционных заболеваний является снижение устойчивости патогенных микроорганизмов к антимикробным препаратам [41, 157]. Особый интерес заслуживают стафилококки или метициллин-резистентные штаммы (MRS), которые являются причиной внутрибольничных и внебольничных инфекций [41, 157]. Среди MRS-штаммов чаще всего обнаруживается золотистый стафилококк, штаммы которого устойчивы к многим представителям группы β -лактамов антибиотиков, включая такие как пенициллины, цефалоспорины, монобактамы, карбапенемы др. [41, 157, 169]. Не менее опасным штаммом является грамотрицательная бактерия *E. coli*, которая присутствует в кишечнике человека и может быть причиной различных

инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта и мочеполовой системы [41, 157].

1.7. Данные по стандартизации сырья дуба черешчатого

Кора дуба черешчатого является фармакопейным сырьем в РФ, качество которой регламентируется ГФ РФ XIV издания (ФС.2.5.3.0071.18). Раздел «Подлинность» включает также качественную реакцию на дубильные вещества с раствором железа (3) аммония сульфата (черно-синее окрашивание) [20, 44]. Раздел «Количественное определение» регламентирует проводить определение суммы дубильных веществ методом 1 (ОФС.1.5.3.0008.18), при этом Арбитражным методом обнаружения ДВ в ЛРС и ЛРП является спектрофотометрический метод (метод 2), что, вероятно, связано с особенностями спектрофотометрического метода – высокой чувствительностью и воспроизводимостью [20]. Нормируемые числовые показатели: ДВ – не ниже 7 %, влажность – не выше 15 % [20, 50, 70, 36]. Подходы к стандартизации суммы ДВ в Европейской фармакопее и в Британской фармакопее аналогичны ГФ РФ, различается только нормируемый предел содержания дубильных веществ устанавливаемый Европейской фармакопеей (не менее 3,0 %, выраженных в виде пирогаллола в пересчете на сухое вещество [132, 120]).

Вопрос усовершенствования методик анализа БАВ в ЛРС дуба черешчатого до сих пор остается важным в направлении стандартизации. В рамках изучения данного вопроса, рядом авторов Казанского государственного медицинского университета, а также химического института им. А.М. Бутлерова Казанского федерального университета были проанализированы недостатки фармакопейной методики определения дубильных веществ в ЛРС такие как сложность в фиксации контрольной точки титрования и завышенность результатов анализа. Авторами была разработан способ анализа дубильных веществ в ЛРС, в том числе в коре дуба черешчатого методом кулонометрии [2], отличающаяся простотой проведения эксперимента, без необходимости предварительной стандартизации титранта, применения стандартных образцов. Отличает данную методику среди

всех имеющихся ее универсальность, возможность использовать для анализа широкого круга ЛРС, содержащих ДВ [2].

Учеными Московской медицинской академии им. И.М. Сеченова была разработана методика определения подлинности коры дуба черешчатого методом тонкослойной хроматографии. В ходе проведения эксперимента были определены оптимальные условия хроматографирования (смеси растворителей для подвижной фазы, детектирующий реагент, характеристики зон хроматограммы), обеспечивающие наилучшее разделение фенольных соединений коры дуба, что говорит о возможности использования метода ТСХ-анализа для определения подлинности коры дуба [32].

Рядом авторов предлагались различные подходы к анализу дубильных веществ в ЛРС с использованием современных инструментальных методов. Так, авторами Е.И. Рябининой, Е.Е. Зотовой и Н.И. Пономаревой предлагается использование метода потенциометрического титрования при определении ДВ в ЛРС. В результате проведенных исследований показана возможность использования данного метода наряду с фармакопейным методом как для определения суммы дубильных веществ, так и для отдельных групп танинов [82]. Авторами А.А. Сорокиной и А.И. Мараховой был предложен метод потенциометрии в качестве альтернативного фармакопейного метода титриметрии, для стандартизации и анализа как сырья, так и препаратов («Стоматофит», «Тонзилгон Н», «Миртикам»), содержащих кору дуба черешчатого [91]. Преимущества метода потенциометрического анализа по сравнению с фармакопейным методом (метод титриметрии) заключается в отсутствии субъективного фактора как в процессе анализа так и при интерпретации полученных данных [63, 82, 91].

Авторами А. М. Калининым, Т. Н. Боковой, Н. П. Антоновой проводилось исследование по обзору имеющихся литературных данных по стандартизации сырья, содержащего дубильные вещества современными инструментальными методами. Обнаружено, что для получения объективных данных при анализе сырья, содержащего ДВ, методом ВЭЖХ следует использовать

очищенные экстракты растений. Для качественной оценки дубильных веществ также рекомендуется использовать качественные реакции, методы ТСХ и ВЭЖХ анализа. Для количественной оценки рекомендуется использовать метод титриметрии, спектрофотометрии и метод ВЭЖХ анализа [37].

Автором Абдуллиной С.Г. предлагается использовать кулонометрический метод анализа для определения ДВ в ЛРС [2].

Поскольку на сегодняшний день существует достаточно большое количество данных, свидетельствующих о наличии сырья дуба черешчатого фенольных соединений (фенологликозидов, фенолокислот, дубильных веществ, флавоноидов и др.) [168], то, поэтому, Московскими учеными был разработан раздел «Качественные реакции» нормативной документации на проведение анализа для ЛРС коры дуба черешчатого методом хроматографии в тонком слое [32]. В результате, автором была разработана методика установления подлинности сырья дуба методом ТСХ, предложена хроматографическая система «этилацетат – толуол – кислота муравьиная безводная – вода» в соотношении (30:10:5:2), которая обеспечивает наилучшее разделение фенольных соединений коры дуба, при использовании раствора СО галловой кислоты [32].

Таким образом, вопросы стандартизации ЛРС дуба черешчатого, в основном, сконцентрированы на методах анализа дубильных веществ, как на доминирующей группе БАВ. Методики стандартизации дубильных веществ для данного сырья имеют ряд недостатков, поскольку в коре дуба черешчатого присутствует группа веществ – флавоноиды, то вопрос проведения стандартизации БАВ по данной группе веществ остается не полностью изученным.

1.8. Лекарственные препараты на основе сырья дуба черешчатого и перспективные направления использования их в медицинской практике

Не смотря на достаточную популярность дуба черешчатого в хозяйственной деятельности человека, не уменьшается интерес к его изучению в области медицины и фармации как в России, так и за рубежом: постепенно расширяется база данных относительно химического состава и фармакологических свойств

данного растения. Так, в Германии с 1976 года используются таблетированные формы с покрытием на основе сухого экстракта (5,0-6,5:1), экстракционный растворитель: этанол 50 %, применяемые в качестве вспомогательного лечения при неспецифической острой диарее, перорально, 1 таблетка с покрытием, содержащая 140 мг сухого экстракта [10].

Кора дуба применяется при простудных заболеваниях, язв в ротовой полости, геморроях и несварения желудка. Дубильные вещества, встречающиеся в коре дуба, как сообщается, обладают различной активностью: антисекретолитической, антиирритантной, антимикробной и противопаразитарной. Традиционно дубовая кора использовалась для лечения неспецифической диареи, воспаления полости рта и горла, а также легких повреждений кожи [33, 114].

Вяжущая способность экстрактов коры дуба в основном обусловлена содержанием в них олигомерных проантоцианидов. При связывании водородом имеющиеся полигидроксифенольные группы сшиваются с белками (Martin and Wallace 2006). Этот эффект также участвует в процессе дубления кожи. Фенольные группы дубильных веществ могут взаимодействовать с белками слюны, слизи, желудочного содержимого и эпителиальных клеток желудочно-кишечного тракта [36, 100].

Используя экспериментальную модель индуцированного повреждения желудка у крыс обнаружено, что водный экстракт коры *Quercus ilex* или дубильной кислоты может быть гастропротектором (Gharzouli et al. (1999)). Экспериментальные доклинические данные подтверждают вяжущую, гастропротекторную, антибактериальную и противовирусную активность коры дуба, подтверждают и поддерживают целесообразность ее терапевтического применения [10, 33]. Противогрибковые, антипротозойные, противопаразитарные, противоопухолевые и другие эффекты могут быть подтверждены при анализе отдельных активных компонентов коры дуба. В дерматологической терапии дубовая кора рекомендуется для местного лечения ран в качестве вяжущего средства, способствующего остановке кровотечений [10].

Комитет по растительным лекарственным средствам в ходе проведения оценки коры *Quercus robur* L., *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., *Quercus pubescens* Willd., пришел к выводу, что кора дуба может использоваться в качестве: 1) традиционного растительного лекарственного средства для симптоматического лечения легкой диареи, 2) традиционного растительного лекарственного средства для симптоматического лечения незначительного воспаления слизистой оболочки полости рта или кожи [114].

В коре дуба содержится биологически активное вещество – кверцетин. Кверцетин входит в состав таблеток «Кверсалин» и применяется также при заболеваниях связанных с нарушением работы сердца и сосудов, заболеваниях крови, при опухолях [10, 154].

Традиционно кора дуба применяется в качестве отвара [164]. В коре дуба содержится значительное количество дубильных веществ, которые и обеспечивают вяжущее действие соответствующего отвара. Также в коре дуба содержится танины, получаемые из чернильных орешков (*Gallae turcicae*), которые являются наростами малоазиатского дуба и некоторых растений семейства сумачовых. Назначают в виде растворов и мазей. В коре дуба содержится значительное количество дубильных веществ, которые и обеспечивают вяжущее действие соответствующего отвара [100].

Учеными из Новгородского государственного университета им Ярослава Мудрого изучались возможности использования экстракта дуба черешчатого при разработке стоматологической полимерной пленки, которые показали высокую эффективность при заболеваниях десен. В результате проведенной работы был разработан оптимальный состав стоматологической фотоплёнки с экстрактами коры дуба, плодов аронии черноплодной, плодов черники, а также предложены методы оценки качества лекарственных пленок [33]. Данное направление работы говорит о перспективности использования экстрактов коры дуба черешчатого в стоматологической практике.

Не менее важным, с точки зрения ученых Национального фармацевтического университета (г. Харьков), является направление разработки перевязочных средств

на основе густого экстракта коры дуба (ГЭКД) [103]. Противовоспалительное, вяжущее, антимикробное и противовирусное свойство в ГЭКД обеспечиваются за счет основных БАВ дубильных веществ.

Также украинскими учеными из Национального университета биоресурсов и природопользования Украины экстракционными методами было изучено антиоксидантное действие водных экстрактов коры дуба. В результате чего было выявлено антиоксидантное действие, которое очевидно связано с наличием в исследуемом сырье веществ флавоноидов и смеси фенолкарбоновых и гидроксикоричных кислот [97].

Перспективным направлением использования экстрактов коры дуба в стоматологической практике для лечения воспалительных заболеваний полости рта является создание нового геля, содержащего экстракт коры дуба и экстракт алоэ и исследование их терапевтического действия на слизистой мембране полости рта в условиях экспериментального стоматита [64].

В качестве популярного препарата используется кора дуба до сих пор очень часто используется для лечения хронического катара желудка, менструальной анемии и энуреза [1, 10]. Кора содержит дубильную кислоту: «Особой областью терапии дубильные вещества является хронический катар»; но также при хроническом нефрите дубильные вещества должны оказывать благоприятное воздействие, уменьшая количество выделяемого белка с повышенным диурезом [10, 1]. В дополнение к этому антиальбинурическому свойству, хорошие результаты также наблюдались с кровотечением из почек и постоянным отеком селезенки после периодических периодов [1, 10].

Экстракты коры дуба входят в состав различных комплексных препаратов, обладающих противовоспалительным, антисептическим действием, таких как «Стоматофит», «Тонзилгон Н», «Дентос», «Фитодент», «Витадент» и др. [61, 64, 69, 77, 107].

При воспалительных заболеваниях полости рта и пародонта (в т.ч. осложненные микробной флорой) при лечении и профилактики часто применяется препарат «Витадент», который широко используется для ухода за дёснами и

слизистой полости рта, лечения пародонта и применения в хирургической практике [77]. Препарат содержит экстракт коры дуба, обеспечивающий фармакологический эффект препарата [77]. Еще одним препаратом растительного происхождения, применяемый в стоматологической практике является препарат «Стоматофит» [62, 61]. Препарат обладает вяжущим, смягчающим, противовоспалительным действием в отношении слизистой оболочки полости рта благодаря содержанию экстрактов коры дуба, листьев шалфея и цветков ромашки. Кроме того, дубильные вещества и эфирные масла, содержащиеся в препарате, оказывают антисептическое (антибактериальное и противогрибковое действие) на слизистую оболочку ротовой полости и десен [61, 62, 69]. Не менее значимым является препарат «Дентос» [107]. Препарат используется в виде лекарственной формы геля, который обеспечивают комплексный антимикробный, регенерирующий и противовоспалительный эффект [107]. Препарат Фитодент также находит применение в стоматологической практике [64]. Проводимые исследования настойки «Фитодент», на основе которого разрабатывался гель подтвердили постоянство состава макро- и микроэлементов и обнаружили 19 элементов, которые являются необходимыми и важными для нормального протекания процессов в ротовой полости элементов, что способствует защите тканей пародонта, слизистых оболочек и зубов при различных патологических процессах [64].

Таким образом, дуб черешчатый достаточно широко применяется в различных областях жизнедеятельности человека. Однако, на наш взгляд ЛРС дуба черешчатого в медицинской практике имеет широкие перспективы. Проведенный обзор литературы показал значимость данного объекта для создания лекарственных препаратов, используемых в патологиях различного генеза. Многими авторами проводилась и ведется работа по усовершенствованию имеющихся способов стандартизации ЛРС дуба черешчатого и создаются новые методики анализа БАВ в коре дуба черешчатого. Тем не менее, использование других морфологических органов дуба черешчатого, таких как листья, почки не представляют достаточного интереса для современной фармацевтической

практике, в то время как имеются данные о перспективах их использования в отечественной и зарубежной медицинской практике.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Проведенный обзор литературы показал, что лекарственное растительное сырье рода *Quercus* L. и, в частности, вида *Quercus robur* L. является перспективным источником ценных БАВ и может использоваться для создания новых лекарственных препаратов. Исследования выполненные отечественными и зарубежными учеными в основном касаются изучения коры дуба черешчатого, в то время как листья и почки дуба черешчатого остаются малоизученными объектами.
2. Обнаружено, что фитомасса дуба черешчатого в фармацевтической практике в большинстве случаев используется не рационально. Выявлена перспективность других морфологических органов, в частности, листьев, почек, многолетней коры и особенности их химического состава.
3. Ведущая группа БАВ коры дуба черешчатого представлена в виде дубильных веществ: галловая кислота, эллаговая кислота, танины (олигомерные проантоцианидины эллагитанины; флавано-эллагитанины; галлотанины мономерные и димерные катехины и лейкоцианидины танины). Второй группой действующих веществ являются флавоноиды: кверцетин, кверцитрин, 3-глюкозид и 3-рамнозид кемпферола, 3-глюкозид изорамнетина, рутин, кемпферол, апигенин. Также в сырье присутствуют терпены - фриделин, фриделинол, 3-фриделанол. Ведущей группой БАВ листьев дуба черешчатого являются флавоноиды. В листьях также присутствуют дубильные вещества.
4. Отечественными и зарубежными учеными были выявлены следующие фармакологические свойства сырья дуба: антибактериальные; противовоспалительное, антисептическое, противоопухолевое, противовирусное, иммуностимулирующее; литолитическое, глистогонное средство, а также свойства, связанные с наличием дубильных веществ: антисекретолитическое, антиирритантное, антимикробное и противопаразитарное и др. Экспериментальные доклинические данные

подтверждают вяжущую, гастропротекторную, антибактериальную и противовирусную активность коры дуба.

5. Остается открытым вопрос диагностики и стандартизации ЛРС дуба черешчатого и его близкородственных видов фитохимическими и морфолого-анатомическими методами.
6. Отмечается отсутствие данных по изучению антимикробной активности листьев и почек морфологических органов дуба черешчатого.
7. Не смотря на имеющиеся данные по стандартизации ЛРС дуба черешчатого (коры), в НД все же имеются ряд недостатков, вследствие чего отечественными и зарубежными учеными ведутся исследования по совершенствованию методик анализа сырья.
8. Выявлен интерес ученых к изучению листьев дуба черешчатого, однако отсутствуют методики проведения их стандартизации, что свидетельствует о необходимости углубленного изучения данных химического состава, разработки соответствующих методик анализа сырья, с подбором соответствующих параметров экстракции.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика объектов исследования, используемых в процессе написания научно-исследовательской работы

В качестве объектов диссертационного исследования использовались следующие образцы сырья: листья дуба черешчатого (*Quercus robur* L.); кора дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) – (фармакопейное сырье); кора дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) (промышленный образец); почки дуба черешчатого (*Quercus robur* L.). Образцы заготавливались в период с 2019 по 2021 гг.

Образцы ЛРС:

- Листья дуба черешчатого, заготовленные на участке Ботанического сада г. Самара в период с 2019 по 2021 гг.;
- Листья дуба черешчатого, заготовленные в Похвистневском районе Самарской области (с. Первомайск) в период с 2019 по 2021 гг.;
- Листья дуба скального - *Quercus petraea* Liebl.; дуба красной - *Quercus rubra* L.; дуба летнего фастигиата - *Quercus robur* var. *fastigiata* (Lam.) Spach.; дуба монгольского - *Quercus mongolica* Fisch. ex Ledeb.; дуба крупноплодного - *Quercus macrocarpa* Michaux и дуба Мюллербурга - *Quercus Muehlenbergii* Engelm., заготовленные на участке Ботанического сада г. Самара в период с 2019 по 2021 гг.;
- Кора дуба черешчатого (АО «Красногорсклессредства» г. Красногорск);
- Кора дуба черешчатого, промышленный образец деревоперерабатывающей компании ООО «ДУО» (адрес: г. Самара, ул. Белорусская 75а);
- Почки дуба черешчатого, заготовленные в Похвистневском районе Самарской области (с. Первомайск) в период с 2019 по 2021 гг.;

Видовую специфичность всех исследуемых образцов морфологических органов дуба черешчатого и некоторых представителей рода *Quercus*

подтверждали при помощи определителей средней полосы России [1, 11, 12, 15, 27, 59, 60, 65, 70, 105, 106].

В рамках диссертационного исследования изучались водно-спиртовые извлечения и спиртовые настойки изучаемых видов ЛРС:

- Настойка листьев дуба черешчатого, полученная в лабораторных условиях.
Состав настойки: Дуба черешчатого листьев 300,0 г
Спирта этилового 70 % до получения 1,5 л настойки (1:5);
- Настойка коры дуба черешчатого на спирте этиловом (С %: 40 %, 60 %, 70 % и 96 %).
- Настойка почек дуба черешчатого на спирте этиловом (С %: 70%).
- Водно-спиртовые извлечения листьев, почек и коры в концентрациях спирта этилового марки ХЧ (40 %, 60 %, 70 %, 80 %, 96 %);
- Индивидуальные вещества: астрагалин, афзелин, кверцитрин, изокверцитрин, 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.
- Стандартные образцы: рутин; кверцетин; кверцитрин; цинарозид; кемпферол; танин; галловая кислота; катехин, кемпферол, изорамнетин;

Приборы и аппаратура, использованные в процессе проведения диссертационной работы:

- 1) Весы аналитические «Mettler Toledo XS 204»; весы Мора ВА-4М; весы технические «ВСМ-1», «ВСМ-5»; весы электронные марки «САРТО ГОСМ ЛВ 210-А»;
- 2) Прибор спектрофотометр «СФ-2000» (ОКБ Спектр) «Specord 40» (Analytik Jena); [102, 104, 7, 45, 66];
- 3) Прибор «Bruker AM 300» (300 МГц) для регистрации ^1H -ЯМР спектров. Прибор «Bruker DRX 500» (126,76 МГц) для регистрации ^{13}C -ЯМР спектров; Прибор «Bruker micrOTOF II» для регистрации масс-спектров;
- 4) Термостат лабораторный «ТС-1/80»;

- 5) Системы для хроматографического анализа (смеси растворителей в различных соотношениях: бутиловый спирт-ледяная уксусная кислота-вода, хлороформ-этанол-вода, хлороформ-этанол) [102, 104, 7, 45, 66];
- 6) Пластинки хроматографические «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ».
- 7) Системы для хроматографирования: н-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (БУВ), хлороформ-этанол 96 % - вода, этанол 96 % - хлороформ в различных соотношениях [102, 104, 7, 45, 66];
- 8) Аквадистиллятор марки «ДЭ-4-02» «ЭМО» (Россия);
- 9) Жидкостной микроколоночный хроматограф Милихром-6 (НПАО «Научприбор»); хроматографическая колонка стальная Элсико Kromasil C18 (5) (2 мм × 80 мм);
- 10) Микроскопы:
 - Световой микроскоп «Мотик» DM – 1802 (кратность увеличения: 4x10, 10x10; 40x10, 100x10);
 - Световой микроскоп «Мотик» DM - 39C - N9GO – А;
 - Люминесцентный микроскоп марки «Альтами ЛЮМ-2». Люминесцентный анализ проводился с использованием голубого и желтого светофильтра 32 мм. Источником света служила высоковольтная ртутная лампа (НВО 100Вт); спектральный диапазон возбуждения люминесценции: голубой светофильтр - 420-550 нм; желтый светофильтр - 330-400 нм (кратность увеличения: 4x10, 10x10; 40x10, 100x10).;
 - Световой микроскоп марки ZEISS ZEN 2. Использовалось лицензионное программное обеспечение ZEISS Software Licensing | V1.0 en 04 / 2018;
- 11) Набор сит со стандартным диаметром отверстий;
- 12) Фильтровальная бумага для хроматографии (FN-11, FN-15);
- 13) Микротом марки «Thermo scientific» «НМ 325 Manual microtome» «REF 901140, SN S19112191». Использовались оригинальные лезвия марки «Thermo scientific» (США), «MX35 Ultra-Microtome Blade, с углом заточки 34 ° и шириной лезвий 80 mm, REF 3053835» (Япония), серия № 9E240004/3013835-CN (США). Толщина срезов микропрепаратов составила 30–35 мкм.

- 14) В качестве тестовых культур были использованы штаммы Американской коллекции типовых культур (ATCC): *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), а также *Candida albicans* (клинический штамм) [102, 104, 7, 45, 66].
- 15) 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.

Реактивы и индикаторы:

- 1) Спирт этиловый 96 % марки ХЧ, ООО «Гиппократ», Россия, г. Самара, серия: 360917). Необходимые концентрации спирта были получены путем разведения спирта этилового 96 %, по таблице № 5 приложения к ГФ РФ XIV издания [20].
- 2) Хлороформ марки ХЧ (трихлорметан, «Компонент-Реактив», СТП ТУ СОМР 2-028-06, ООН 1888);
- 3) Спиртовой 5 % раствор алюминия хлорида III;
- 4) Индикатор – раствор индигосульфокислоты (приготовление раствора осуществлялось по методике ГФ РФ с использованием индигокармина марки ЧДА, 090015ЛР. ТУ 6 09 714 71, АО «Ленреактив» (Россия).
- 5) Титрованный (стандартный) раствор перманганата калия 0,02 М. Использовался стандарт-титр калия марганцовокислого [0,1 н.] (марка ЧДА, серия: 101070) (Россия).
- 6) Фосворно-вольфрамовая кислота (ФВК) (5 % - ный водный раствор).

2.2. Характеристика методов, используемых в процессе написания научно-исследовательской работы

2.2.1. Методики микроскопического анализа

В соответствии с планом диссертационной работы проводилось исследование микроскопических признаков свежих морфологических органов дуба черешчатого и некоторых представителей рода *Quercus*, которые

подвергались сушке в естественных условиях [49]. Для свежего и высушенного сырья различия в содержании БАВ установлены не были. Проводилась пробоподготовка сырья (листья, кора, почки), в процессе выполнения которой опирались на следующую нормативную документацию: ГФ XI и XIV издания [20, 21, 22, 31, 49]. Свежее собранное растительное сырье до проведения анализа помещалось смесь, состоящую из глицерина, спирта этилового (96 %) и вода очищенной в следующем соотношении – «1:1:1» [7, 45, 66, 102, 104].

Использовался метод светлого поля в проходящем свете на микроскопах (кратность увеличения микроскопа: х 40, х 100, х 400) [7, 45, 66, 102, 104]. Приготовление микропрепаратов осуществлялось с использованием микротомы марки «Thermo scientific» «HM 325 Manual microtome» «REF 901140, SN S19112191». Использовались оригинальные лезвия марки «Thermo scientific» (США), «MX35 Ultra-Microtome Blade, REF 3053835» (Япония), серия № 9E240004/3013835-CN (США). Толщина срезов микропрепаратов составила 30–35 мкм. 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. Микрокопирование сырья и окраска срезов осуществлялась исходя из требований требованиями актуальной ОФС [20]. В ходе эксперимента кутиновый слой эпидермиса и липофильные структуры протопласта клеток окрашивали 0,5 % раствором Судана III в спирте этиловом 96 % [5, 20, 31]. Лигнификация клеточных оболочек диагностировалась по лимонно-желтому окрашиванию после обработки срезов 5 % водным раствором сернокислого анилина [5, 7, 20, 31, 45, 66, 102, 104].

Микроскопический анализ сырья осуществлялся по ОФС для листьев, коры и почек ГФ РФ XIV издания [20].

В процессе микроскопического анализа использовались следующие гистохимические реакции, которые осуществлялись по представленным ниже методикам [20, 21, 31].

1. *Реакция для обнаружения кутинизированной поверхности эпидермы.* Кутинизированные оболочки клеток эпидермиса окрашивались раствором Судан III в розовый цвет [5, 7, 20, 31, 45, 66, 102, 104].

2. *Реакция для обнаружения одревесневших оболочек клеток.* Одревесневшие и лигнифицированные оболочки клеток окрашивались в желтый цвет [5, 20, 31].

3. *Реакция для обнаружения крахмалоносных клеток.* Крахмальные включения окрашивались в сине-фиолетовый цвет [5, 7, 20, 31, 45, 66, 102, 104].

2.2.2. Физические методы анализа

В соответствии ГФ РФ XIV издания оценивали плотность полученных настоек, используя набор ареометров общего назначения [20, 21, 22].

2.2.3. Химические методы анализа

В ходе предварительного анализа химического состава сырья были проведены пробирочные реакции на основные группы БАВ:

- *Реакция с раствором железоаммониевых квасцов* [13, 17, 20, 45, 50, 67, 102].
- *Реакция с раствором железа хлорида (III)* [7, 13, 17, 20, 45, 66, 50, 67, 102, 104].
- *Реакция 1 % раствор ванилина в концентрированной HCl;*
- *Цианидиновая реакция (проба Shinoda)* [13, 17, 20, 50, 67];
- *Реакция с 3 % спиртовым раствором $AlCl_3$* [7, 13, 17, 20, 45, 66, 50, 67, 102, 104];
- *Реакция с щелочным раствором диазобензолсульфокислоты* [7, 13, 17, 20, 45, 66, 50, 67, 102, 104];
- *Реакция Либермана-Бурхарда* [7, 13, 17, 20, 45, 66, 50, 67, 102, 104];
- *Реакция кислотного гидролиза.* К анализируемому гликозиду в количестве 5-10 мг добавляли 3 мл 2 % раствора хлористоводородной кислоты, затем нагревали в течение полу часа на кипящей водяной бане. Контролировали протекание гидролиза методом ТСХ. Затем полученную в ходе гидролиза кристаллическую

смесь охлаждали и отфильтровывали, используя стеклянный фильтр. Надосадочную жидкость упаривали и анализировали углеводы методом бумажной хроматографии [50, 54].

2.2.4. Хроматографические методы анализа

1. Тонкослойная хроматография (ТСХ) [17, 20, 50].

Метод хроматографии в тонком слое сорбента использовался в ходе проведения колоночной хроматографии, а также для анализа БАВ в извлечениях ЛРС представителей рода *Quercus*.

Хроматографические пластинки перед анализом пластинки помещались в термостат при температуре 100-105 °С.

В ходе исследования использовались следующие хроматографические системы: бутиловый спирт – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2), «хлороформ – спирт этиловый 96 %» в различных соотношениях, «хлороформ – спирт этиловый 96 % - вода» (25:18:2) и «хлороформ – спирт» (9:1).

Образцы наносили капилляром на обозначенную линию старта на пластинке, после этого пластинку погружали в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную парами системы растворителей в течение 24 часов. Хроматографирование осуществляли восходящим способом. Анализ считали завершенным, когда фронт растворителя достигал 7-8 см.

После извлечения из системы хроматограммы высушивали и оценивали визуально при дневном свете. Дополнительно пластинки просматривали в УФ-свете при 254 и 366 нм, затем обрабатывали [17, 20, 50].

2. Адсорбционная жидкостная колоночная хроматография [17, 20, 29, 81, 101, 152].

Указанным методом был изучен химический состав водно-спиртового извлечения из листьев дуба черешчатого. Для проведения колоночной хроматографии использовался сорбент – силикагель КСКГ измельченный (фракция 0,04-0,10 мм, ГОСТ 3956-76, производитель: Sorbis Group). Применялись

следующие элюенты: хлороформ, спирт этиловый 96 %, смеси спирта этилового и хлороформа в различных соотношениях и вода очищенная.

Для дальнейшей очистки фракций, полученных в ходе колоночной хроматографии и содержащих отдельные БАВ листьев дуба черешчатого, использовались следующие сорбенты: силикагель указанной марки, полиамид для колоночной хроматографии (производитель Woelm Pharma, Германия) [29].

3. Высокоэффективная жидкостная хроматография [13, 17, 101].

ВЭЖХ-анализ осуществляли на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») с ультрафиолетовым детектором в следующих условиях: градиентный режим, стальная колонка «Элсико» (№ 28042; 2 мм x 80 мм; Kromasil C18; 5 мкм), подвижная фаза - смесь ацетонитрила и воды в соотношении 2:8 с подкислением уксусной кислотой, скорость движения растворителя - 100 мкл/мин, объем растворителя - 2500 мкл, объем пробы 2-6 мкл. Аналитическая длина волны – 360 нм [20, 29, 50, 81, 101, 152].

2.2.5. Физико-химические методы анализа

1. Спектрофотометрия [18, 20, 50].

Спектрофотометрия. Метод УФ-спектрофотометрии применялся для разработки методик качественного и количественного анализа БАВ морфологических органов дуба черешчатого и некоторых представителей рода *Quercus* L., а также для идентификации выделенных из листьев дуба черешчатого индивидуальных веществ [20]. Работа осуществлялась на приборах СФ «2000» и «Specord 40» (Analytik Jena) в кюветах с толщиной слоя 10 мм в диапазоне длин волн от 190 до 500 нм. Раствором сравнения служил 96 % этиловый спирт. Обработка результатов проводилась с помощью программного обеспечения WinASPECT (Analytik Jena AG), Microsoft Excel (Microsoft Corporation) [102, 104, 7, 45, 66].

ЯМР-спектроскопия и масс-спектральный анализ. Физико-химические и спектральные характеристики выделенных веществ [17] определяли путем регистрации ^1H -ЯМР спектров на приборе «Bruker AM 300» (300 мГц), ^{13}C -ЯМР

спектров на приборе «Bruker DRX 500» (126,76 МГц). Масс-спектры высокого разрешения были зарегистрированы на приборе «Bruker micrOTOF II» методом электрораспылительной ионизации (ESI). Измерения выполнены на положительных (напряжение на капилляре – 4500 V) ионах. Диапазон сканирования масс — m/z 50 — 3000, калибровка — внешняя или внутренняя (Electrospray Calibrant Solution, Fluka). Использовался шприцевой ввод вещества для растворов в метаноле, скорость потока — 3 мкл/мин. Газ-распылитель — азот (4 л/мин), температура интерфейса — 180 °C.

2.2.6. Технологические методы

Описание процесса получения водно-спиртовых извлечений. Для целей научно-исследовательской работы готовились водно-спиртовые извлечения из листьев, коры и почек *Quercus robur* L. и листьев наиболее значимых представителей рода *Quercus* L. на различных экстрагентах (40 %, 70 %, 96 % спирт) по описанной методике:

Около 1,0 г (точная навеска) сырья, измельченного до размера частиц 2 мм, переносили в термостойкую колбу на 100 мл и прибавляли 50 мл экстрагента, затем колбу взвешивали. Производили нагрев колбы с присоединенным обратным холодильником в течение 60 минут на кипящей бане. После остывания колбы и извлечения доводили массу колбы до первоначального значения с помощью добавления экстрагента. Полученное извлечение фильтровали во флаконы темного стекла [102, 104, 7, 45, 66].

Описание технологии получения настойки листьев дуба черешчатого. Для получения настойки использовался. Настойку листьев дуба черешчатого получали на 70 % этаноле в соотношении 1:5 с использованием метода дробной перколяции [7, 45, 66, 102, 104].

День 1. Используется три перколятора на 250 мл. В каждый перколятор помещают по 70,0 г измельченных листьев дуба черешчатого (до 5 мм). В три перколятора, установленных один над другим заливают 1,5 объема от сырья – 315 мл 70 % этанола, оставляют для настаивания в течение 24 часов при комнатной температуре предварительно закрыв установку пробкой.

День 2. Через перколяторы проливают необходимый объем 70 % спирта этилового – 1050 мл, данный объем рассчитывается из соотношения «сырье – экстрагент» – 1:5, контролируя необходимый объем экстрагента над сырьем (зеркало), при скорости перколяции 1 капля в три секунды. Полученный готовый продукт – настойку, фильтруют через ватно-марлевый тампон и затем помещают во флакон темного стекла и укупоривают пробкой из полимерных материалов.

2.2.7. Микробиологические методы анализа

В качестве образцов использовались образцы водно-спиртовых извлечений листьев и почек дуба черешчатого на различных концентрациях спирта этилового марки ХЧ (40 %, 70 %, 80 %, 96 %) в соотношении «сырье – экстрагент» (1:50). Также были получены препарат настойка листьев дуба черешчатого и настойка почек дуба черешчатого на 70 % спирте этиловом в соотношении «сырье – экстрагент» (1:5), полученная методом дробной перколяции. Необходимые концентрации спирта были получены путем разведения спирта этилового 96 %, по таблице № 5 приложения к ГФ РФ XIV издания [20].

В качестве тестовых культур были использованы штаммы Американской коллекции типовых культур (American Type Cultures Collection - ATCC): *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), а также *Candida albicans* (клинический штамм).

Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) проводили методом двойных серийных разведений в бульоне (пробирочный, макрометод) в соответствии с методиками, описанными в МУК 4.2.1890-04 [73, 159]. В качестве питательной среды использовался питательный бульон Мюллера-Хинтона (Bio-Rad, США).

Методика проведения микробиологического анализа. Тестирование исследуемых образцов проводилось в объеме 1 мл каждого разведения образца водно-спиртового извлечения. Питательный бульон разливали по 0,5 мл в пробирки для исследования. Одну пробирку использовали в качестве «отрицательного» контроля. Анализируемое извлечение в объеме 0,5 мл вносили в первую пробирку стерильной пипеткой, перемешивали, затем отбирали из этой же

пробирки исследуемый раствор в объеме 0,5 мл и помещали во вторую пробирку, в которой находился первичный объем бульона в объеме 0,5 мл, процедуру повторяли для всех последующих пробирок, взятых для анализа. Из последней пробирки получившегося ряда отбирали 0,5 мл бульона. Таким образом, получали ряд пробирок с растворами тестируемых образцов извлечений листьев, коры и почек дуба черешчатого, концентрации которых отличались от соседних пробирок в 2 раза. Параллельно готовили серию разведений для «контрольного» опыта проверки антимикробного действия той концентрации спирта, на которой было получено извлечение. Для подготовки штамма микроорганизма использовали стандартную микробную взвесь, равную 0,5 мл по стандарту МакФарланда, которую предварительно разводили в сто раз на питательном бульоне, после чего концентрация микроорганизма в ней составляла около 10^{-5} КОЕ/мл. Далее микробную взвесь в объеме 0,5 мл помещали в пробирки для исследования с оттитрованным раствором питательной среды, а также в пробирку для «отрицательного» контроля в аналогичном объеме. После выполнения данных манипуляций концентрация микроорганизма в пробирках ряда была около 5×10^{-5} КОЕ/мл. Затем, пробирки ряда для анализа, в том числе пробирки отрицательного контроля, укупоривали стерильными ватно-марлевыми пробками и все пробирки с тестируемыми штаммами, и помещали в термостат при температуре 35 °С в течение суток. Пробирка с «отрицательным» контролем помещали в холодильник при 4 °С [73, 159]. По истечении времени пробирки оценивали на наличие роста штаммов микроорганизмов при дневном свете при сравнении с отрицательным контролем. Минимальная подавляющая концентрация оценивалась по наименьшей концентрации тестируемого образца, которая подавляет видимый рост микроорганизма [73, 159].

При этом согласно требованиям МУК 4.2.1890-04, а также рекомендациям Стандарта производительности для тестов на чувствительность к антимикробным препаратам (CLSI), наличие мутности, и обнаружение незначительного количества микроорганизмов (одна колония) не учитывались при регистрации результата

эксперимента. Количество повторений каждого эксперимента было равным трем [73, 159].

2.2.8. Фармакологические методы анализа

Проводилось исследование диуретической активности вещества диагностически значимого вещества астрагалина. Для исследования отбирались 20 лабораторных беспородных белых крыс (половозрелые самцы), которых делили на две группы: 1 группа для проведения эксперимента, 2 группа для проведения контрольного опыта. Отбирались крысы, массой 200-250 г. Соблюдались стандартные требования по уходу и диете.

В процессе проведения эксперимента по изучению диуретической активности вещества астрагалина использовали дозировку 0,005 г/кг. Всем испытуемым крысам за 24 часа давалась водная нагрузка (объем - 3 % от массы тела крысы). Далее по истечении 24 часов крысы группы контроля (группа 2) получали внутривентрикулярно водно-спиртовую нагрузку, а группа 1 (экспериментальная) получала вещество астрагалин (объем – 3 % от массы тела крысы). Затем крыс группы 1 и группы 2 оставляли на 24 часа в обменных клетках. Далее проводился сбор порций мочи (4-х- и 24-х-часовых). После выполнения процедуры по сбору мочи определялся уровень креатинина, который осуществлялся колориметрическим методом. После этого проводилась статистическая обработка полученных результатов осуществлялась по критерию Манна-Уитни с использованием программного обеспечения Statistica 8.0 и Microsoft Excel 2020 «Пакет анализа».

Исследование острой токсичности препарата «Дуба черешчатого листьев настойка» проводилось в соответствии с государственными требованиями к безопасности (ГОСТ 12.1.007-76) [19]. Изучались две группы крыс. Первая группа получала внутривентрикулярно однократно настойку листьев дуба черешчатого в дозе 15 г/кг на фоне 3 % водной нагрузки, вторая, контрольная группа – 70 % спирт в аналогичном объеме. В первый день эксперимента за животными велось непрерывное наблюдение. Проводилось 6 серий опытов, в течение 14 дней. [102, 104, 7, 45, 66].

ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПЕРСПЕКТИВНЫХ ОРГАНОВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО (*QUERCUS* *ROBUR L.*)

На сегодняшний день актуальной проблемой современной ботаники и ряда прикладных дисциплин, в частности, фармакогнозии и систематики растений, является определение видовой специфичности растительных объектов.

Ввиду широкого видового разнообразия представителей рода *Quercus*, возникает необходимость в диагностике и стандартизации видов внутри таксономической группы, в том числе морфолого-анатомическими методами [80].

В ГФ РФ на данный момент включена ФС на кору дуба [20]. Наряду с корой дуба перспективным объектом, также, являются листья дуба черешчатого и некоторых представителей рода *Quercus*, что подтверждается многочисленными исследованиями зарубежных и отечественных ученых [6, 56, 57, 68, 109, 119, 116, 119, 121, 123, 131, 136, 138, 149, 172, 173, 174, 172].

В данной главе нами приводится описание морфолого-анатомических особенностей строения не фармакопейных видов сырья - листьев и почек дуба черешчатого с использованием световой и люминесцентной микроскопии.

3.1. Сравнительная морфология листовых пластинок видов рода *Quercus*

Для проведения сравнительного анализа были отобраны образцы 4-х экземпляров близкородственных вида дуба черешчатого, произрастающих на территории РФ в Самарской области – дуба черешчатого – (*Q. robur L.*) и возделываемых на территории Самарской области: дуба скального - *Quercus petraea* Liebl.; дуба летнего фастигиата (пирамидальный) - *Quercus robur var. fastigiata* (Lam.) Spach. и дуба Мюлленберга - *Quercus muehlenbergii* Engelmann.) (рис. 3).

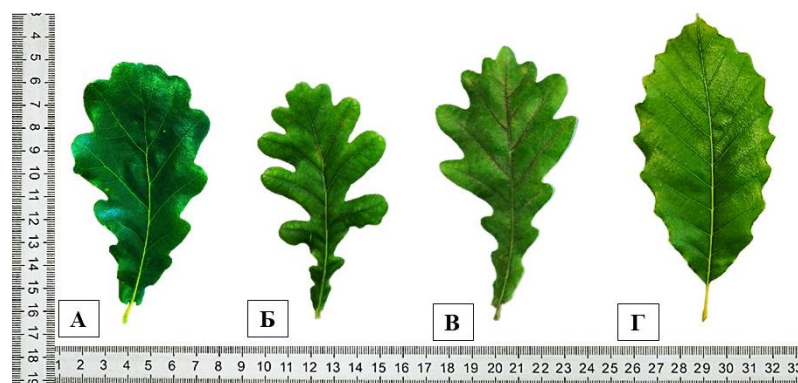


Рисунок 3 – Образцы листьев представителей рода *Quercus*: А – дуб черешчатый; Б – дуб скальный; В – дуб пирамидальный фастигиата; Г – дуб Мюллленберга

Видовая специфичность и определение принадлежности к таксономической группе определялись по размерам, типу и форме листа, особенностям строения края листа, цвету верхней и нижней стороны листа, строению листа, типу жилкования, характеру основания и верхушки листа, длине черешка и структуре листа. Гербарные образцы обсуждаемых видов (см. приложение № 3; рис. 4).

Выявлено, что некоторые из представленных видов обладают схожими признаками: для дуба черешчатого, дуба скального и дуба пирамидального отмечается схожее строение листовой пластинки, которая морфологически продолговато-обратнойцевидная, перисто-лопастная, глубоко и неправильно лопастная. Схожим признаком также является характер жилкования и особенности строения верхушки листовой пластинки. Строение листа дуба Мюллленберга морфологически несколько отличается от остальных видов характерным заострением на верхушке, у остальных из представленных видов верхушка листовой пластинки тупая или овальная. Результаты сравнительного анализа морфологии листовых пластинок отражены в таблице 2 (приложение № 3; табл. 2). Сходными строения листовых пластинок для всех образцов являются: тип листа – простой, черешковый; цвет – варьируется от темно-зеленого до светло-зеленого; характер опушения – у представленных видов опушена только нижняя часть листовой пластинки; жилкование – сетчатое у всех видов; основание листовой пластинки – клиновидное, за исключением дуба пирамидального (клиновидное

неравнобокое) и дуба черешчатого (в основании которого присутствуют ушки с обеих сторон основания листа) (приложение № 3; табл. 2). Описанные особенности морфологического строения для листьев дуба черешчатого подтверждаются данными литературных источников [1, 27, 59, 59, 60, 70, 95, 105].

Выявленные особенности морфологического строения видов рода *Quercus* являются важным этапом проведения морфолого-анатомического анализа.

3.2. Морфолого-анатомическое исследование листьев дуба черешчатого *Quercus robur* L.

Листья дуба черешчатого изучались многими учеными, что говорит о его перспективности [6, 56, 57, 68, 109, 116, 119, 121, 123, 131, 136, 138, 149, 166, 172].

Наряду с методом световой микроскопии ЛРС достаточно показательным является метод люминесцентной микроскопии, позволяющий проводить локализацию и диагностику БАВ в тканях сырья. Для объективной оценки и интерпретации данных люминесцентного анализа морфологических органов дуба черешчатого нами были получены микрофотографии люминесценции стандартных образцов при $\lambda=420$ нм и $\lambda=360$ нм: галловой кислоты, рутина, кемпферола, кверцитрина, кверцетина, а также диагностически значимого вещества астрагалина (рис. 5).

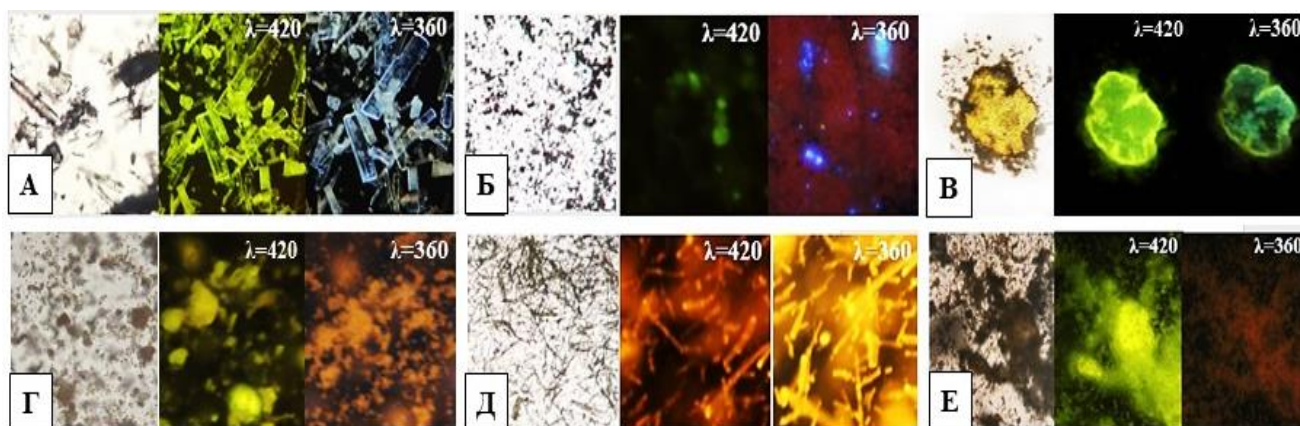


Рисунок 5 – Сравнительная люминесценция стандартных образцов в детектировании в видимом свете, при облучении $\lambda=420$ нм и $\lambda=360$ нм.

Обозначения: А – СО галловой кислоты; Б – СО рутина; В – СО кемпферола;

Г – СО кверцитрина; Д – СО кверцетина; Е – вещество астрагалин

В ходе проведения микроскопического анализа листьев дуба черешчатого выявлено, что эпидермис верхней стороны листа состоит из разноразмерных клеток неправильной, многоугольной формы. Клеточные стенки эпидермальных клеток целлюлозные без выраженных пор. Протопласты клеток слабо пигментированы (рис. 6А).

При облучении верхнего эпидермиса листьев дуба черешчатого при $\lambda=420$ нм наблюдается желто-оранжевое свечение, при $\lambda=360$ нм – розово-красное (рис. 6Б, В). Следует отметить, что розово-красная люминесценция эпидермиса постепенно сменяется на розо-голубую, а затем на голубую при движении от края листовой пластинки к ее центру (рис. 6).

Эпидермис снизу листа состоит из клеток неправильной угловатой формы (рис. 6-Г). По всей поверхности листовой пластинки четко видны устьица аномоцитного типа, которые светятся желтым по краю и зеленовато-желтым цветом в центре при $\lambda=420$ нм и розово-красным по краям и голубым цветом по центру при $\lambda=360$ нм (рис. 6Г, Д). Отмечается характерная особенность расположения устьичных аппаратов, которые сгруппированы по 2-6 устьиц по всему нижнему эпидермису (рис. 6З и 5И).

На нижней стороне листа присутствуют одноклеточные простые волоски, люминесценция которых представлена на рисунке 6. На нижней стороне листа также присутствуют железистые волоски, люминисцирующие ярко-желтым цветом с оранжево красной головкой при $\lambda=420$ нм и розово-красным цветом при $\lambda=360$ нм (рис. 6).

Эпидермис над жилками снизу листа представлен вытянутыми клетками, опушенными одиночными простыми одноклеточными волосками и ветвистыми волосками в виде пучков по 2-4 лучевых волоска, с гладкой поверхностью, длина которых составляет в среднем до 100 мкм (рис. 6Ж). Необходимо отметить высокую диагностичность выявленных волосков, которые были описаны ранее для других органов дуба черешчатого, в частности для плодов [70]. Люминесценция

волосков и эпидермиса жилки нижней стороны листовой пластинки аналогична люминесценции верхнего эпидермиса (рис. 6).

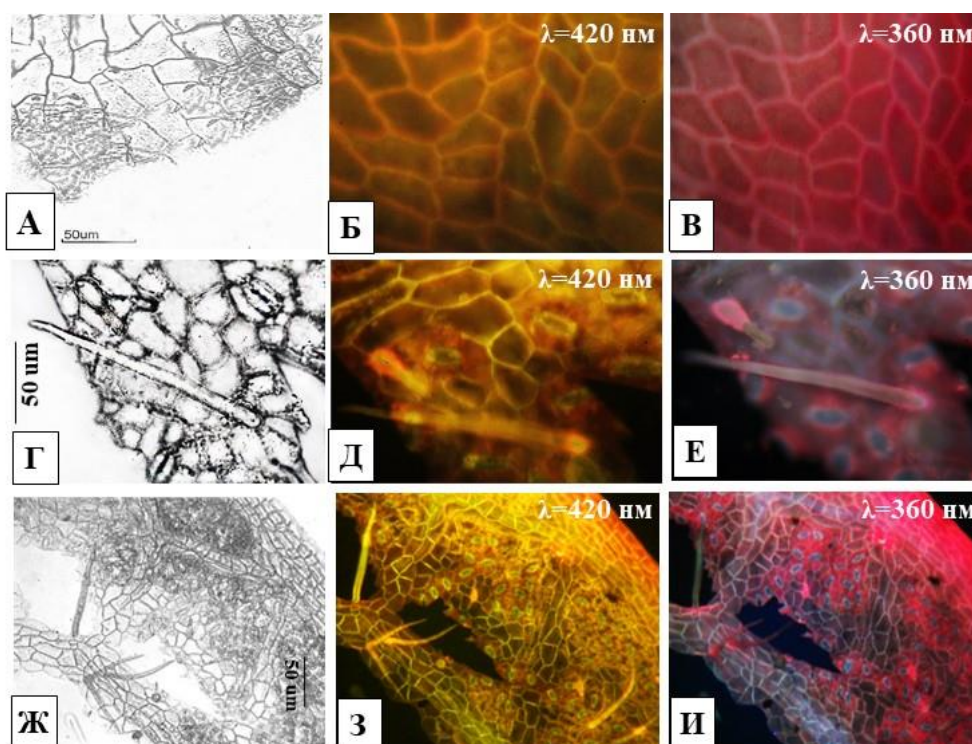


Рисунок 6 – Особенности строения эпидермиса листа дуба черешчатого. А – Эпидермис верхней стороны (x400); Г – Эпидермис нижней стороны (x400); Ж – Эпидермис жилки нижней стороны (x100); Б, Д, Е – облучение $\lambda=420$ нм; В, Е, И – облучение $\lambda=360$ нм

По краю нижней и верхней сторон листовой пластинки отмечается уменьшение размера клеток эпидермиса. Клеточные стенки при этом утолщаются относительно основной эпидермы листа. Непосредственно по краю виден выраженный слой кутикулы (рис. 7).

Край листовой пластинки ровный, без выступов, с верхней стороны не опушен (рис. 7). По нижнему краю листовой пластинки присутствуют устьица аномоцитного типа и одноклеточные простые волоски (рис. 7). Люминесценция устьиц при облучении $\lambda=420$ нм и $\lambda=360$ нм представлена на рисунках 7г и 7д соответственно, свечение которых характерно для веществ галловой кислоты (рис. 7 и 5)

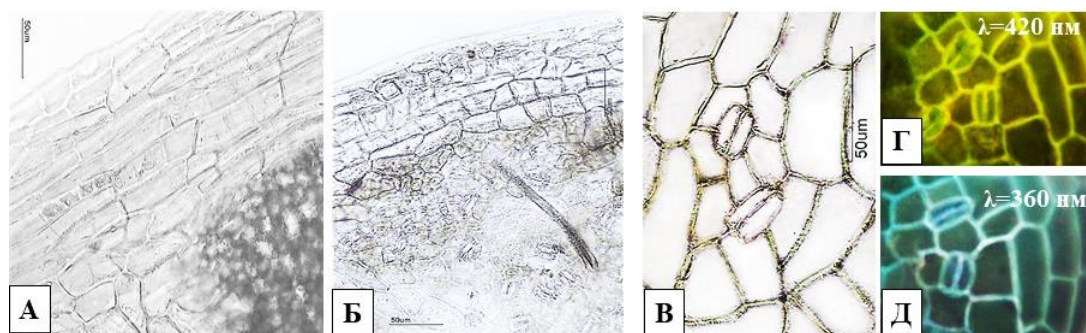


Рисунок 7 – Эпидермис края листовой пластинки дуба черешчатого: А – Край верхней стороны листа (x400); Б – Край нижней стороны листа (x100); В – Устьица листа (x400); Г – Облучение $\lambda=420$ нм (x400); Д – облучение $\lambda=360$ нм (x400)

При исследовании поперечных сечений листовой пластинки выявлено, что анатомически пластинка дорсовентральная (рис. 8). Форма центральной жилки листа на поперечном сечении округлая. С верхней и нижней стороны незначительно армирована слабо выраженной уголкообразной колленхимой (рис. 8). Основной объем центральной жилки листа на поперечном сечении занимает проводящая ткань. Структура пучка сложная, состоит из 3-х крупных блоков в виде закрытых плотно сомкнутых коллатеральных пучков, отмеченных нами на рисунке 9А штрих-пунктиром (рис. 9А).

Колленхима борта, адаксиальной и абаксиальной частей люминисцирует схожим образом при $\lambda=420$ нм – желто-зеленым, при $\lambda=360$ нм – голубовато-зеленым цветом (рис. 8).

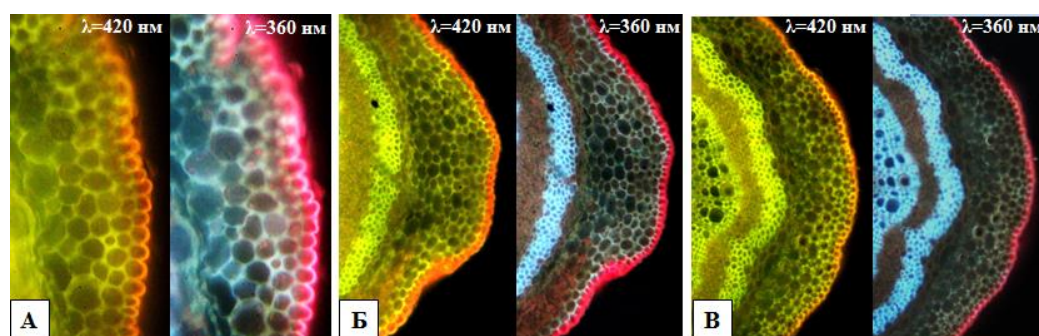


Рисунок 8 – Люминесценция поверхности поперечных срезов листа дуба черешчатого (x400) при облучении 420 нм и 360 нм соответственно. А – Борт листа; Б – Адаксиальная сторона; В – Абаксиальная сторона

При проведении гистохимических реакций микропрепаратов поперечных срезов медиальной части листовых пластинок были получены следующие результаты. После проведения реакции с раствором сернокислого анилина отмечается ярко-желтое окрашивание проводящей системы и тканей склеренхимы (рис. 9В). В процессе проведения гистохимической реакции с 5 % раствором Судана III отмечается окрашивание кутикулы и механического пояса в оранжево-красный слой (рис. 9Д). После обработки раствором Люголя в центре поперечного среза наблюдается темно-синее окрашивание содержимого клеток, что говорит о наличии крахмальных зерен (рис. 9Е).

На протяжении всей жилки листовой пластинки встречаются друзы оксалата неправильной формы (рис. 9Д).

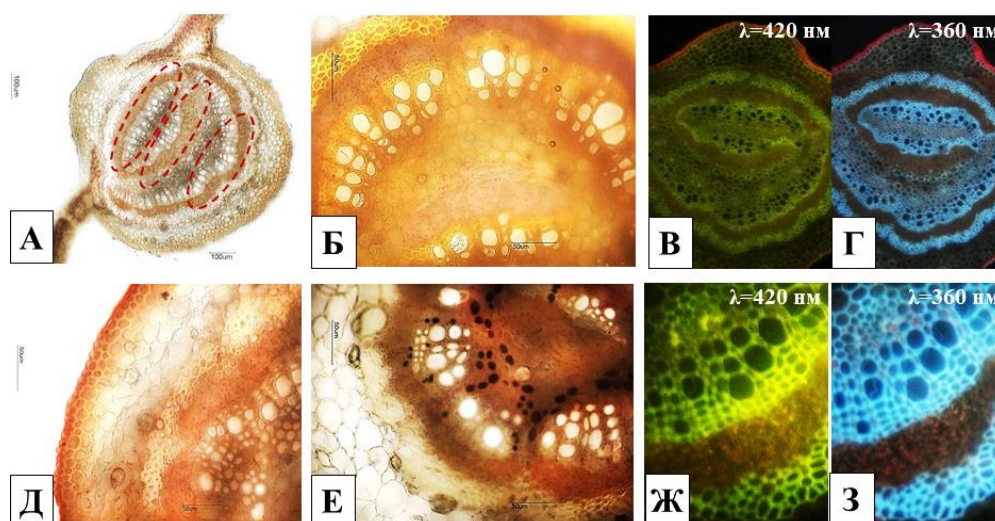


Рисунок 9 - Поперечный срез медиальной части листовой пластинки: А – Общий вид поперечного среза (x100); Б – Обработка 5 % раствором судана 3 (x400); В – Обработка раствором сернокислого анилина (x400); Г – Обработка раствором Люголя (x400); Д, Ж – облучение $\lambda=420$ нм (x100; x400); Е, З – облучение $\lambda=360$ нм (x100; x400)

Флоэма обоих пучков пигментирована за счет аморфных протопластов клеток в тёмно-бурый цвет. Ксилема пучков, занимающая больший объём относительно флоэмы, пигментирована слабо (рис. 9Ж и 9З). По периферии пучков со стороны флоэмы достаточно хорошо различим механический пояс - склеренхима (рис. 9Д), отмечается выраженность колленхимных клеток в адаксиальной части (рис. 8А-В и рис. 9В).

Относительно локализации веществ в тканях листьев дуба черешчатого, можно предположить наличие в них следующих веществ имеющих схожие картины люминесценции при длинах волн $\lambda=420$ нм и $\lambda=360$ нм. Наличие ярко-голубой люминесценции при $\lambda=360$ нм совпадает с люминесценцией при той же длине волны стандартных образцов галловой кислоты (рис. 5; рис. 8 и рис. 9В,Ж). Желто-зеленая люминесценция при $\lambda=420$ нм и оранжево-красная при $\lambda=360$ нм позволяет предположить наличие в проводящей системы и механической ткани листовой пластинки веществ рутина, кемпферола, кверцитрина, а также диагностически значимого вещества астрагалина, выделенного из листьев дуба черешчатого методом колоночной хроматографии (рис. 5; рис. 8 и рис. 9Г,З).

Таким образом, были изучены микроскопические признаки строения поперечных сечений листовой пластинки дуба черешчатого.

3.3. Исследование петиолярной анатомии *Quercus robur* L.

Одним из методов, используемых при диагностике и стандартизации растений, является петиолярная анатомия [18, 20, 53, 53, 89, 109, 136, 138, 149]. Петиолярные признаки играют важное значение в определении видовой специфичности таксона растительных объектов, поэтому изучение особенностей петиолярной анатомии листьев является перспективным направлением при подтверждении подлинности растений в процессе определения видовой принадлежности внутри таксономической группы. При анализе петиолярных признаков дуба черешчатого мы исходили из уже имеющихся литературных данных [109].

Черешок листа дуба черешчатого – небольшой, от 0,5 до 1,5 см в длину, опушённый одноклеточными волосками (рис. 11Е); по бортам черешка в апикальной части присутствуют характерные выступы (рис. 11Ж, 3, И). Основание черешка, его базальная часть, в сравнении с апикальной частью значительно расширено (рис. 10). Размеры поперечных сечений в самой длинной части, через центр черешка составили: базальная часть – от 2,6 мм до 2,8 мм, медиальная – от 2,1 мм до 2,3 мм, апикальная – от 1,4 мм до 1,6 мм.

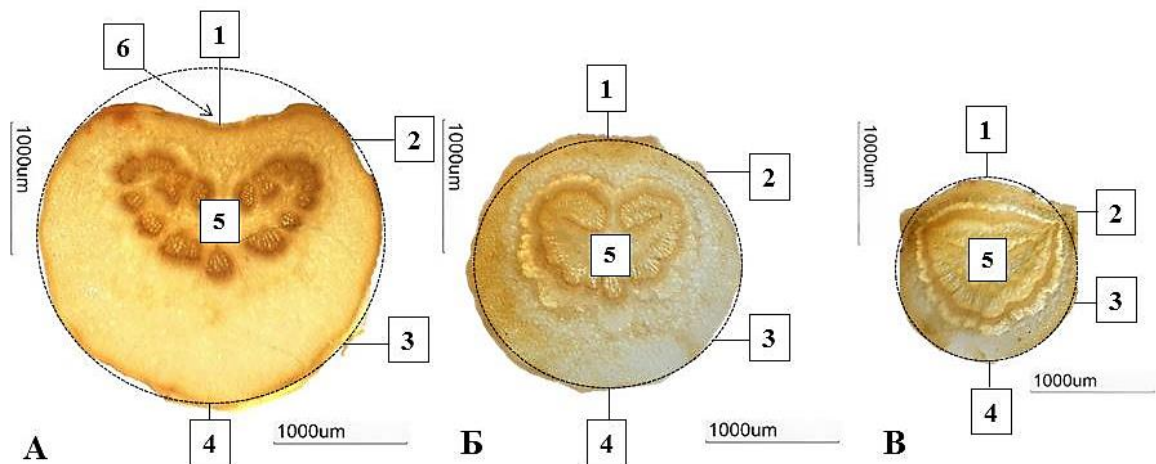


Рисунок 10 – Поперечные срезы черешка листа *Quercus robur* L. (x40): А – Базальная часть; Б – Медиальная часть; В – Апикальная часть. Обозначения: 1 – адаксиальная сторона; 2 – ребро; 3 – борт; 4 – абаксиальная сторона, 5 – проводящие пучки; 6 – углубление с адаксиальной стороны.

Очертания базальной, медиальной и апикальной частей, выделенные штрих-пунктиром на рисунке 2, более-менее округлые и отличаются наличием (базальная часть) (рис. 10А и 10Б) или отсутствием (медиальная и апикальная части) выемки с адаксиальной стороны черешка (рис. 10).

Эпидермис продольных срезов черешков опушен простыми одиночными одноклеточными волосками и ветвистыми волосками по 2 лучевых волоска с гладкой поверхностью, длина волосков составляет в среднем до 100,5 мкм. Расположены волоски по всей поверхности черешка, преимущественно ближе к апикальной части, к основанию листовой пластинки (рис. 11Е). Клетки эпидермиса черешков на поперечных срезах паренхимные, более или менее прямоугольной

формы. Клеточные стенки, примыкающие к паренхиме, тонкие целлюлозные. С наружной и радиальных сторон они значительно утолщены. С поверхности эпидермис кутинизирован, что подтверждено окраской раствором Судана III (рис. 11) [20, 31].

В базальной и медиальной частях основная паренхима черешка заметно развита, в апикальной слабо выражена (рис. 10).

Проведение реакции с раствором Судан III в зонах основной паренхимы черешка и сердцевины позволяет выявить липофильные структуры протопластов основных тканей (рис. 11А). При окрашивании микропрепарата раствором сернокислого анилина отмечается изменение цвета клеток механической ткани на ярко-желтый цвет (рис. 11Б, Г).

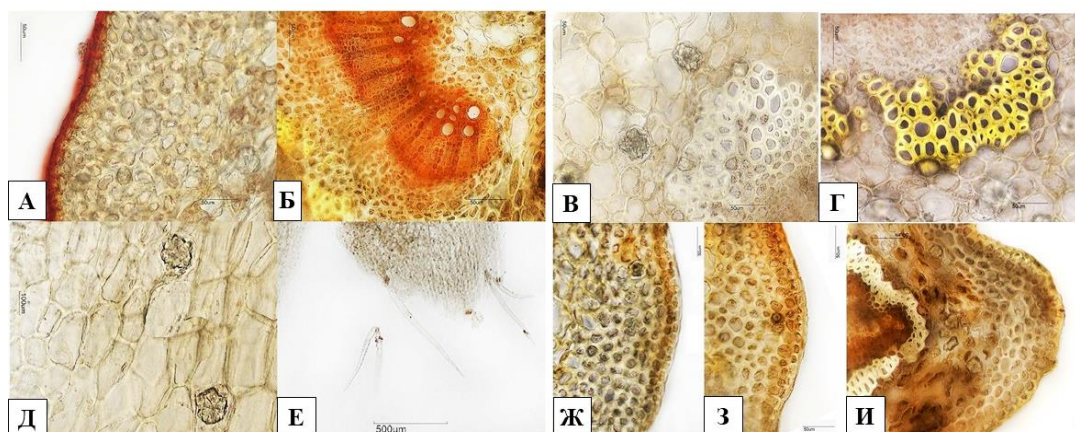


Рисунок 11 – Поперечные срезы медиальной части черешка листа *Quercus robur*

L.: А, Б – Окраска эпидермиса и проводящей системы раствором Суданом III (x100); В, Г – склеренхима до и после окраски сернокислым анилином; Д – Друзы; Е – Простые одноклеточные волоски; Ж, З, И - Поперечные срезы ребер черешка в базальной, медальной и апикальной частях соответственно

Паренхима представлена разноразмерными клетками с нативно бурым протопластом, диаметр их варьирует от 13,1 мкм до 55,4 мкм (рис. 12А-В). В паренхиме часто встречаются друзы звездчатой формы с диаметром от 13,8 мкм до 37,5 мкм (рис. 12А-В). Особенно много их наблюдается на поперечных срезах в медиальной части черешка (рис. 11В). Также друзы присутствуют и на продольных срезах эпидермиса (рис. 11Д).

Склеренхимные волокна на поперечном сечении разноразмерные, неправильной более-менее овальной формы, диаметром от $10,2 \pm 0,25$ мкм до $41,7 \pm 0,10$ мкм. Лигнификация склеренхимы подтверждается окраской раствором серноокислого анилина (рис. 11Г). В склеренхиме отмечается незначительная кристаллоносная обкладка из монокристаллов неправильной формы (рис. 11В и 11Г).

По бортам черешка, ближе к адаксиальной стороне, имеются ребра (рис. 12Г). Они наиболее выражены в апикальной части поперечного среза (рис. 11И и 12Г). Ребра на поперечном сечении имеют вид треугольных выступов, которые переходят в расширяющуюся листовую пластинку.

В области ребер локализован блок колленхимы (рис. 11Ж-И). Полости клеток колленхимы на поперечном сечении округло-овальные. В их протопласте диагностируются мелкие друзы оксалата кальция. Неравномерно утолщенные клеточные стенки целлюлозные без выраженных пор. Число рядов колленхимных клеток и степень утолщенности их стенок заметно снижается ближе к апикальной части. Диаметр клеток колленхимы варьируется от 10,3 мкм до 30,1 мкм. Число рядов колленхимных клеток варьирует от четырех до шести (рис. 11Г).

Элементы проводящей части черешка расположены кольцом в центре поперечного среза. В зависимости от места среза, общий вид проводящей части черешка различается (рис. 10 и 12А-В).

В базальной части проводящие ткани, расположенные по кольцу, собраны в закрытые коллатеральные пучки, разделенные лучами основных тканей (рис. 10А и 12А). В медиальной части пучки разделены между собой незначительно и загнуты во внутрь, к центру симметрии поперечного среза черешка, с адаксиальной стороны (рис. 10Б, 12Б). В апикальной части поперечного среза кольцо проводящих тканей непрерывное (рис. 10В и 12В).

При облучении люминесцентным микроскопом поперечных срезов листовой пластинки дуба черешчатого выявлено разнообразие люминесцирующих зон, обусловленное различным химическим составом тканей. Так, при облучении поперечных сечений при $\lambda=420$ нм выявлено яркое желто-оранжевое свечение

проводящих тканей ксилемы и склеренхимных волокон черешков, что характерно для дубильных веществ, а также для вещества астрагалина (рис. 12). При облучении указанных тканей черешка при $\lambda=360$ нм клеточные стенки сосудов и волокон люминесцируют ярко-голубым свечением, что характерно для стандартного образца галловой кислоты и кемпферола (рис. 12).

При рассмотрении на малом увеличении в при $\lambda=360$ нм видно, что ткани флоэмы пигментированные светло-коричневого цвета в дневном свете, люминесцируют ярко-красным цветом. Что обусловлено, вероятно, наличием в протопластах хлорофилла, а также некоторых флавоноидов (астрагалина, рутина). Аналогично люминесцирует и покровная часть черешка (рис. 12).

При ближайшем рассмотрении (x400) видно, что розовый цвет люминесценции присущ кутикуле эпидермы и, от части, его внешней клеточной стенке. Протопласты клеток эпидермы не люминесцируют (рис. 12).

Под эпидермальным слоем при $\lambda=360$ нм хорошо заметны клетки механической ткани, клеточные стенки которых в данных условиях облучения люминесцируют ярко-голубым цветом. При этом заметно слабое свечение протопластов клеток механических тканей (рис. 12).

В клетках флоэмы заметны многочисленные мелкие друзы, размерностью от 13,6 мкм до 16,4 мкм (рис. 12). Сосуды ксилемы расположены радиально, диаметр их, как правило, от 8,3 мкм до 41,6 мкм и увеличивается от сердцевины черешка к флоэме (рис. 12). Сосуды армированы волокнами либриформа. Сердцевинные лучи сложены из живых клеток с бурым протопластом. Их целлюлозные клеточные стенки заметно утолщены и не реагируют на реактивы (рис. 12б).

При рассмотрении (x400) проводящих элементов черешков видно, что помимо голубого свечения сосудов ксилемы люминесцируют и протопласты клеток ксилемной паренхимы желто-коричневым цветом. Данное свечение характерно для фенольных соединений и, в частности, флавононов (рис. 12 и 5).

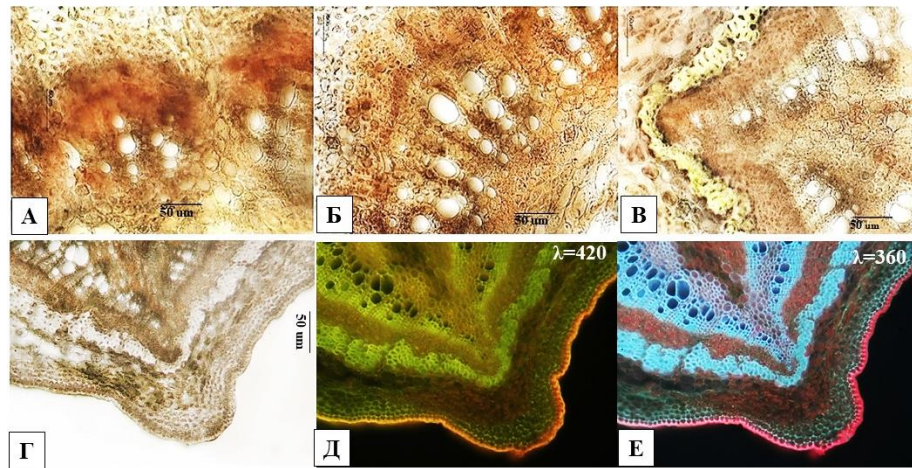


Рисунок 12 – Поперечные срезы проводящей системы черешка: А, Б, В – коллатеральный пучок в базальной, медиальной и апикальной частях соответственно (x400); Г – ребро и проводящая система апикальной части (x100); Д – облучение $\lambda=420$ нм (x100); Е – облучение $\lambda= 360$ нм (x100)

По периферии проводящая часть черешка армирована блоком склеренхимных волокон (рис. 12). В зависимости от степени срастания пучков склеренхима локализована блоками (в базальной части), относительно отдельных пучков либо непрерывным кольцом в апикальной части, повторяя очертания проводящей части черешка (рис. 12).

Результаты данного раздела диссертационного исследования являются важным этапом в разработке подходов к диагностике и определению видовой принадлежности вида внутри таксономической группы *Quercus*.

3.4. Сравнительная петиолярная анатомия видов рода *Quercus* L.

В процессе проведения исследования методом петиолярной анатомии нами сравнивались несколько видов рода *Quercus* L.: дуб черешчатый, дуб скальный, дуб пирамидальный и дуб Мюленберга.

В таблице 3 приведены микрофотографии общего вида поперечных срезов черешков. Пунктирные линии на представленных рисунках отображают общий профиль строения поперечных срезов, который повторялся при исследовании 11 образцов листьев с трех экземпляров каждого вида, отобранных с разного уровня

кроны, в разное время (начало, середина и конец вегетационного периода). Обнаружен ряд отличительных признаков в строении петиолярной анатомии исследуемых видов.

Описание общего вида поперечного сечения черешка *Q. robur* L. приводилось в предыдущем разделе. Следует отметить, что для данного вида отмечается округлое очертание поперечных срезов с углублением в базальной части с адаксиальной стороны, а также ребра треугольной формы по бортам апикальной части черешка с адаксиальной стороны (табл. 3).

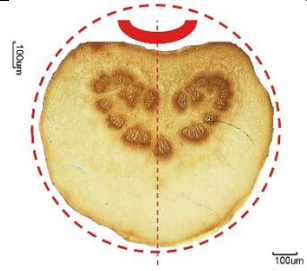
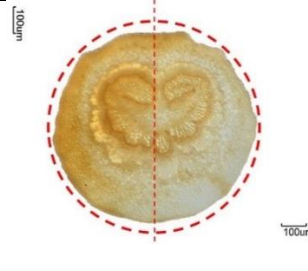
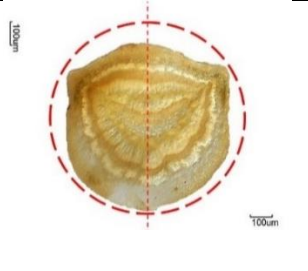
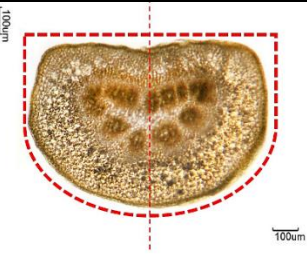
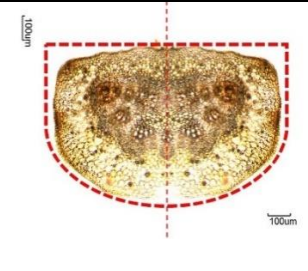
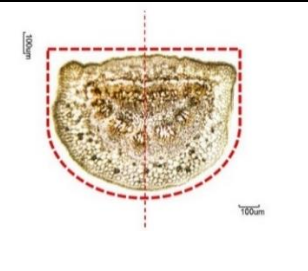
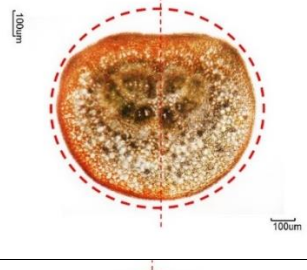
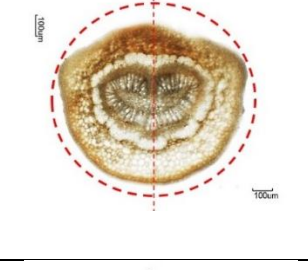
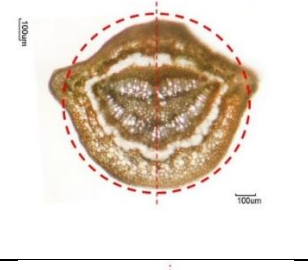
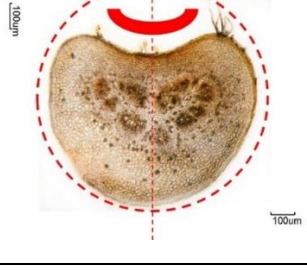
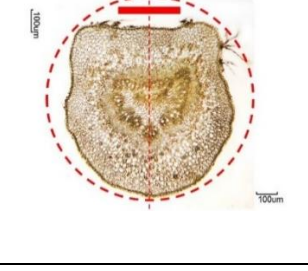
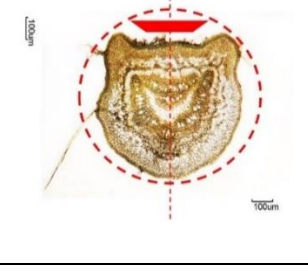
Для *Q. petraea* Liebl. отмечается овальное очертание поперечного среза в абаксиальной части, которая при движении к адаксиальной части приобретает притупленную форму, проводящая система равномерно распределена по всей поверхности, одинаково удалена от поверхности среза (табл. 3).

Для вида *Q. robur* var. *fastigiata* (Lam.) Spach. характерно полукруглое очертание поперечного сечения с незначительным притуплением в адаксиальной части базального среза; в медиальной и апикальной частях заметно выделяются борта поперечного сечения, также заметно выделяется пояс механической ткани и проводящая система, которая к апикальной части постепенно замыкается в виде однородного кольца (табл. 3).

Строение петиолярной анатомии вида *Q. muehlenbergii* Engelm. отличается от описанных выше видов очертанием базального среза, где заметно выделяется U-образным углублением в адаксиальной части, аналогичное строению базальной части *Q. robur* L., однако наличие скоплений одноклеточных волосков по 4-5 и железистых трихом у *Q. Muehlenbergii* является его диагностическими признаками. В медиальной части данного вида наблюдается заметное выделение ребер в очертании поперечного среза и притупление в адаксиальной части. Срез приобретает более вытянутую форму в медиальной части среза. Увеличивается количество волосков и трихом на поверхности среза. В апикальной части наблюдаются следующие признаки: адакисальная часть приобретает обратно-трапецевидную форму; борты черешка становятся более выраженными; структуры проводящей и механической ткани приобретают форму кольца. Они

равномерно распределены и отдалены от поверхности среза и повторяют его форму (табл. 3).

Таблица 3 – Сравнительная петиолярная анатомия поперечных срезов листовых пластинок *Quercus robur* L. и некоторых представителей рода *Quercus* L.

Название вида	Базальная часть	Медиальная часть	Апикальная часть
<i>Q. robur</i> L.			
<i>Q. petraea</i>			
<i>Q. fastigiata</i> '			
<i>Q. Muehlenbergii</i>			

В результате проведенного сравнительного исследования особенностей петиолярной анатомии видов рода *Quercus* были определены их отличительные признаки, которые позволят идентифицировать сырье *Quercus robur* L. от его близкородственных видов при проведении морфолого-анатомического анализа на этапах его стандартизации.

3.5. Морфолого-анатомическое исследование почек дуба черешчатого

Анализу подвергались апикальные (верхушечные) почки побегов (рис. 13). Форма апикальных почек овальная, на вершукше – конусовидная, в длину достигают 6 мм, в ширину – до 4 мм. Цвет почек – бурый. Почки дуба в сложеннии плотно-сомкнутые, на поперечном сечении округлые с незначительными ребрами. Визуально почки не опушены и не имеют смолистых выделений. При дальнейшем анализе были проведены исследования поперечных сечений почек в месте прикрепления к стеблям и ее базальной, медиальной и апикальной частях. Установлена зависимость характера сложения элементов почки от места среза продольных и поперечных сечений [162].

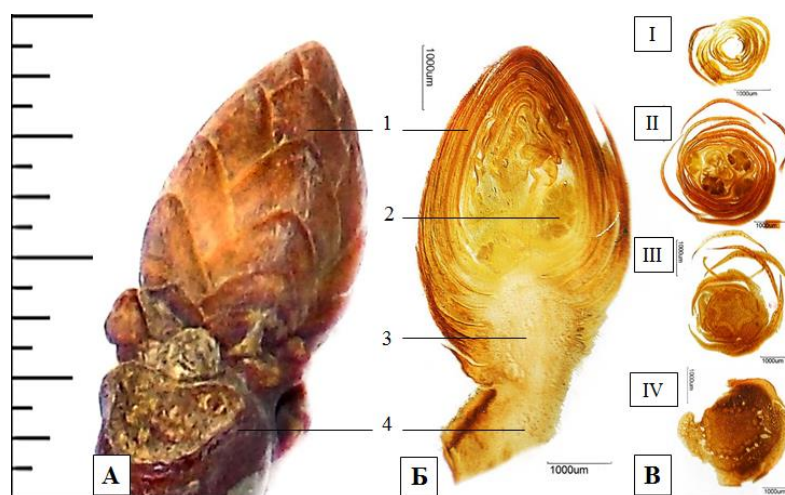


Рисунок 13 – Морфология почек дуба: А – Общий вид; Б – Продольный срез почки (x20); В – Поперечный срез (x40). *Обозначения: 1 – кроющие чешуи; 2 – зачаток соцветия; 3 – стеблевая часть почки; 4 – место прикрепления почки; I – апикальная часть почки; II – медиальная часть почки; III – базальная часть почки; IV – основание почки (стеблевая часть)*

При анализе фрагментов соцветий медиальной части почек дуба, расположенных по окружности зачатков цветков на поперечных срезах при облучении $\lambda=420$ нм в увеличении x100 наблюдается характерное свечение. Данное свечение однородно и наблюдается на протяжении всей поверхности среза, вероятнее всего, что красным светом люминесцирует вещества фенольной

природы: кверцетин (рис. 14). При $\lambda=360$ нм, в увеличении $\times 100$, видно ярко выраженное свечение голубого цвета по периферии среза, что также характерно дубильных веществ (галловой кислоты), и красно-оранжевого свечения в тканях фрагментов соцветий, что характерно для флавоноидов (кверцетина и рутина) (рис. 14).

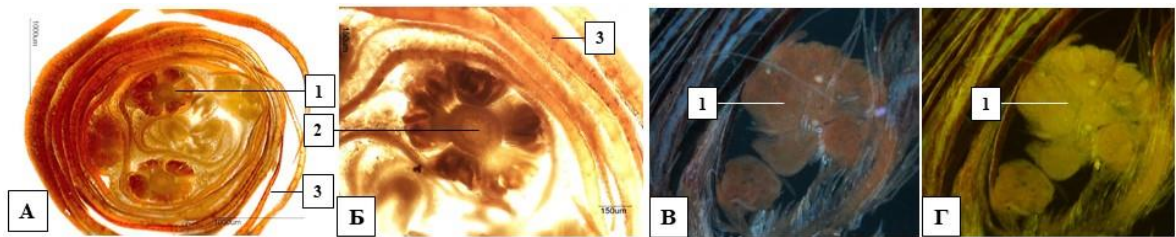


Рисунок 14 – Медиальная часть почки на поперечном сечении: А – Медиальная часть почки на поперечном сечении; Б – Фрагмент соцветия ($\times 100$); В – Облучение при $\lambda=420$ нм ($\times 100$); Г – Облучение $\lambda=360$ нм ($\times 100$). Обозначения: 1 – зачаток соцветия; 2 – ось соцветия; 3 – катафиллы

При увеличении $\times 100$ на протяжении всего продольного среза почек дуба у основания кроющих чешуй присутствует обкладка из нескольких слоев клеток, люминесцирующих ярко-желтым светом при $\lambda=420$ нм и ярко-голубым светом при $\lambda=360$ нм. Подобной люминесценцией обладают клетки паренхимы всего продольного среза (рис. 15).

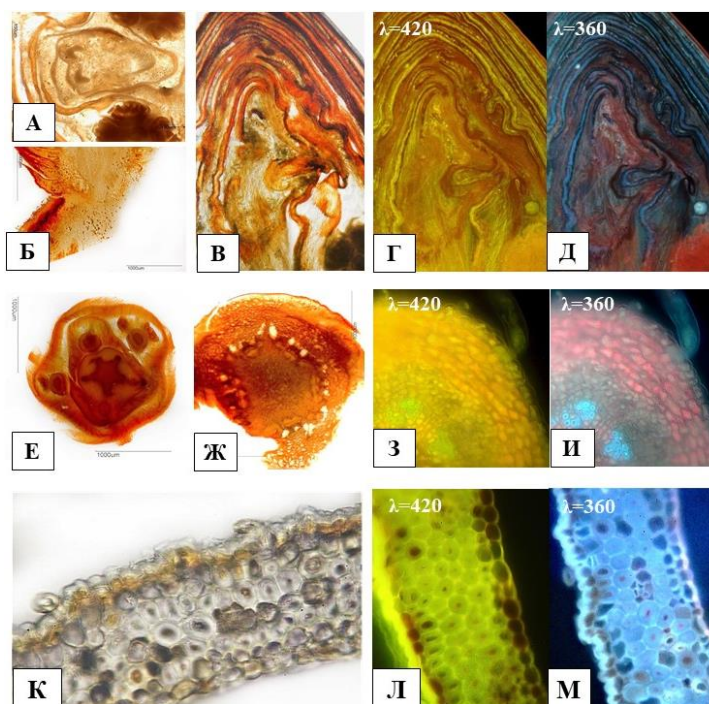


Рисунок 15 – Анатомио-гистологические особенности продольных и поперечных срезов почек дуба черешчатого: А – Примордии на продольном сечении сечении (x100); Б – Стеблевая часть почки на продольном сечении (x100); В – Фрагмент почки с примордиями на продольном сечении (x 40); Г, З, Л – облучение $\lambda=420$ нм (x100); Д, И, М – облучение $\lambda= 360$ нм (x100); Е – Проводящие система стеблевой части поперечного сечения (x100); Ж – Проводящая система базальной части почки; К - Фрагмент катафиллы на поперечном сечении (x400)

Срезы в базальной части почек показали, что ось базальной части почки непучкового типа строения. Проводящие элементы ксилемы и флоэмы расположены непрерывно по окружности осевой части в виде пятиугольника, что возможно расценивать как топографическую особенность вида растения (рис. 15).

Поперечные сечения кроющих чешуй (катафиллов) представлены следующими тканями: мезофилл, содержащий склеренхимные волокна округлой формы; с мелкими проводящими пучками, окрашенных в бурый цвет. Внутренний эпидермис катафиллов сложен из округлых по форме клеток с сильно пигментированным бурым протопластом (рис. 15).

Края кроющих чешуй опушены. Здесь видны расположенные плотным слоем простые одноклеточные тонкостенные волоски.

В ходе проведения анализа выявлено, что верхний эпидермис кроющих содержит кроющие чешуи (рис. 16), стенки которых сильно утолщены. Эпидермальные клетки с поверхности кроющих чешуй вытянутые, угловатые; клетки с внутренней (верхний эпидермис) (рис. 16А) стороны значительно длиннее, чем с нижней (наружной) (рис. 16Б). На верхнем эпидермисе присутствуют железистые трихомы (рис. 16Е).

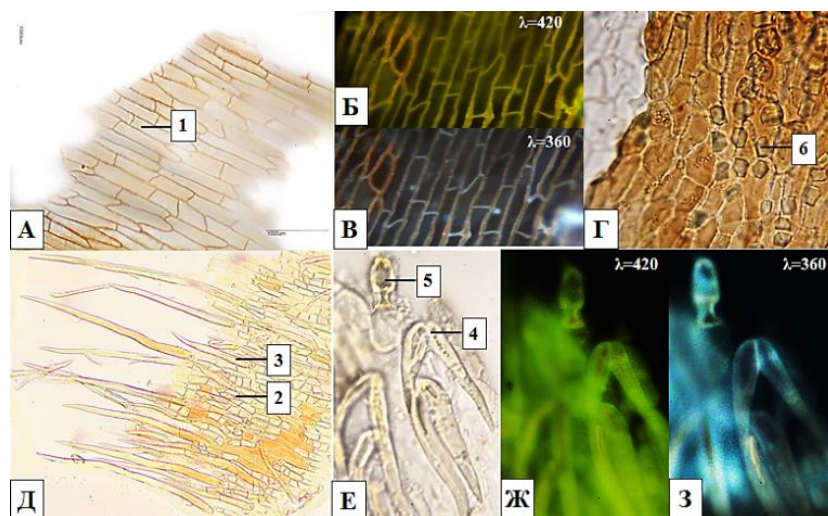


Рисунок 16 – Эпидермис кроющих чешуй почек дуба черешчатого: А, Г – Эпидермис нижней стороны (x100); Б, Ж – Облучение при $\lambda=420$ нм; В, З – Облучение при $\lambda=360$ нм; Д – Эпидермис верхней стороны; Е – Трихомы верхнего эпидермиса. *Обозначения: 1 – клетки нижнего эпидермиса; 2 – клетки верхнего эпидермиса; 3 – простой кроющий волосок; 4 – трихомы; 5 – железистая трихома; 6 – кристаллические включения нижнего эпидермиса*

Сложение почек дуба – полуобъемлющее, формируемое за счет кроющих чешуй. На апикальном срезе видны фрагменты примордиев с V-образным листосложением. На верхней стороне эпидермиса кроющих чешуй обнаружены железистые трихомы и простые кроющие волоски, люминесцирующие зеленым светом при 420 нм и голубым светом при $\lambda=360$ нм. Пучки проводящей системы базальной и стеблевой частей светятся ярко зеленым светом при $\lambda=420$ нм и ярко-

голубым светом при $\lambda=360$ нм, что является характерным для группы дубильных веществ (рис. 5).

Таким образом, проведено морфолого-анатомическое исследование сырья дуба черешчатого – листьев и почек, в ходе которого был определен ряд диагностически значимых признаков и объяснена связь характера свечений тканей с содержанием основных БАВ (флавоноидов и дубильных веществ).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. Проведено морфологическое и анатомо-гистологическое исследование, в ходе которого в дополнение к имеющимся данным определены основные диагностические признаки листьев и почек дуба черешчатого, а также установлена в них локализация БАВ методом люминесцентного анализа.
2. Для листьев дуба черешчатого характерны следующие диагностические признаки: эпидермис и жилка нижней стороны опушены простыми одноклеточными волосками и многоклеточными волосками; на нижней стороне листовой пластинки присутствуют железистые волоски с характерной розово-красной и орнажево-желтой люминесценцией при $\lambda=420$ и $\lambda=360$ нм соответственно. Устьичные аппараты аномоцитного типа. При люминесценции светятся желто-зеленым при $\lambda=420$ нм и голубовато-зеленым цветом при $\lambda=360$ нм. В жилках содержатся кристаллические включения в виде друз и монокристаллов.
3. В ходе исследования петioлярных признаков *Quercus robur* L. выявлены диагностические особенности внешне морфологически схожих листьев анализируемых видов, четко отличающимся по очертаниям поперечных срезов в базальной, медиальной и апикальной частях.
4. Определены диагностически значимые признаки почек дуба: в медиальной части почки сложены хорошо заметными крупными фрагментами соцветий, а также примордиями и катафиллами. На поперечном сечении почки имеют круглую ось побега с проводящими элементами внутри и расположенные по окружности зачатки цветков. На апикальном срезе видны фрагменты примордиев с V-образным листосложением («сложенное»). На верхней стороне эпидермиса кроющих чешуй обнаружены железистые трихомы и простые кроющие волоски, люминесцирующие зеленым светом при $\lambda=420$ нм и голубым светом при $\lambda=360$ нм.
5. Полученные данные предлагается использовать при создании раздела «Микроскопические признаки» проекта фармакопейной статьи на новый вид лекарственного растительного сырья – «Дуба черешчатого листа» и «Дуба черешчатого почки».

ГЛАВА 4. ДАННЫЕ ФИТОХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЛИСТЬЕВ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО

К изучению химического состава листьев дуба черешчатого ранее привлекалось внимание многих ученых [10, 42, 93, 114, 140, 171].

В данной главе нами приводятся результаты изучения химического состава листьев дуба черешчатого на предмет поиска группы БАВ – флавоноидов.

4.1. Выделение индивидуальных веществ из листьев дуба черешчатого

Для целей данного эксперимента был получен спиртовой экстракт листьев дуба черешчатого путем сгущения настойки листьев дуба черешчатого на ротационном испарителе «Labtex ИР-1 ЛТ» до 50 мл из первоначального объема полученной настойки 1500 мл. Настойку листьев дуба получали методом дробной перколяции. Затем спиртовой экстракт листьев дуба смешивали с сорбентом – Силикагель (L 40/100 КСКГ измельчённый, фр. 0,04 – 0,10 мм), затем высушивали. Далее отмеривали чистый силикагель в количестве равном высушенному экстракту, смешанному с силикагелем. Отмеренное количество чистого силикагеля смешивали с чистым хлороформом и помещали в делительную воронку в объеме на 500 мл, предварительно положив на дно воронки ватный диск. Далее открывали воронку, сливали хлороформ и заливали новую порцию чистого хлороформа до зеркала. После чего засыпали смесь экстракта с силикагелем через воронку по частям равномерно распределяя экстракт по поверхности силикагеля. Оставшееся на стенках количество экстракта и силикагеля смывали чистым хлороформом, на поверхность смеси силикагеля и экстракта помещали ватный диск и воронку со стеклянной палочкой во избежание «всплывания» ватного диска и силикагеля. Режим элюирования – градиентный. В качестве подвижной фазы использовали смесь трихлорметана и спирта этилового. Средний объем элюента конкретной концентрации брали в количестве 150-200 мл (табл. 4). В последнюю очередь через колонку пропускали спирт этиловый и воду в объемах 0,5 л. Полученные фракции

сгущали на вакуумном ротационном испарителе до минимального объема менее 10 мл.

Таблица 4 – Схема элюирования экстракта листьев дуба черешчатого

Элюент		Объем элюента, мл	Номера фракций
Хлороформ, %	Спирт, %		
100	0	500	1, 2, 3, 4
99	1	500	5, 6, 7, 8
97	3	500	9, 10, 11, 12
95	5	500	13, 14, 15, 16
93	7	500	17, 18, 19, 20, 21
90	10	1000	22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29
85	15	1000	30, 31, 32, 33, 34, 35
80	20	1000	36, 37, 38, 39, 40, 41
70	30	500	42, 43, 44
60	40	500	45, 46, 47
0	100	500	48, 49, 50, 51, 52
Вода		500	53, 54, 55, 56, 57

Оценка разделения фракций и процесс элюирования проводился визуально, при этом контролировалась и оценивалась насыщенность раствора. Состав фракций оценивалось также методом ТСХ. Фракции, с кристаллическими фрагментами подвергали очистке путем перекристаллизации.

4.2. Исследование фракций, содержащих перспективные индивидуальные вещества, выделенные из листьев дуба черешчатого

Для идентификации веществ, изолированных из экстракта на основе листьев дуба черешчатого, нами были отобраны наиболее значимые фракции:

1. Фракции 39-40 **(1)** [астрагалин], после объединения которых была проведена микро-колоночная хроматография на полиамиде. Вещество

- астрагалин **(1)** было получено при использовании элюента – «трихлорметан : этанол» в соотношении 60:40 при дальнейшей перекристаллизации смесью вода-ацетон;
2. Фракции 3, 5, 9 и 10 **(2)** [афзелин]. Указанные фракции объединялись, которые выпадали в виде желтоватого осадка;
 3. Фракции 36, 37, 38 (осадки) **(3)** [кверцитрин] После объединения данных фракций проводилась микро-колоночная хроматография на полиамиде. Вещество было получено при элюировании смесью «трихлорметан : этанол» в соотношении 60:40. При перекристаллизации смесью «вода-ацетон» наблюдалось выпадение желтоватого осадка;
 4. Фракции 44, 45 и 46 **(4)** [изокверцитрин]. После объединения данных фракций проводилась микро-колоночная хроматография на полиамиде. Вещество было получено при элюировании смесью «трихлорметан : этанол» в соотношении 70:30. При перекристаллизации смесью «вода-ацетон» также наблюдалось выпадение желтоватого осадка;
 5. Фракции 22-29 **(5)** [3-О- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона].
 6. Фракции 17-21 **(6)** [3-О- β -D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-4',-метоксифлавона];
 7. Вещества фракций 51, 52, 53, 54 **(7)** [рамноза], которые были получены путем очистки спиртом этиловым до получения веществ кристаллической формы, беловато-серого цвета.

Анализ химической природы изолированных веществ проводили методами ТСХ, УФ-спектрофотометрии, ЯМР- и масс-спектрального анализа.

По итогам эксперимента, соединения **1, 3, 5 и 7** идентифицированы нами на основании данных УФ-, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР- и масс-спектров как астрагалин, кверцитрин, 3-О- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона и рамноза. Соединения **2, 4 и 6** идентифицированы нами на основании данных УФ-, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР- и масс-спектров как афзелин, изокверцитрин, 3-О- β -D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-4',-метоксифлавона (табл. 5)

Таблица 5 – Характеристики веществ, выделенных из листьев дуба черешчатого методом колоночной хроматографии

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

4.3. Установление химической структуры выделенных веществ

Для идентификации агликонов проводился кислотный гидролиз флавоноидных гликозидов **1**, **2** и **3** в присутствии 2 % HCl на кипящей водяной бане в течение 2 часов. После проведения кислотного гидролиза отмечается сдвиг хроматографических зон для веществ **1**, **2** и **3** с $R_f = 0,66$ до $R_f = 0,54$ (рис. 17). Далее наличие в структуре D-глюкозы в структуре астрагалина и L-рамнозы в структурах афзелина и кверцитрина подтверждали методом бумажной хроматографии.

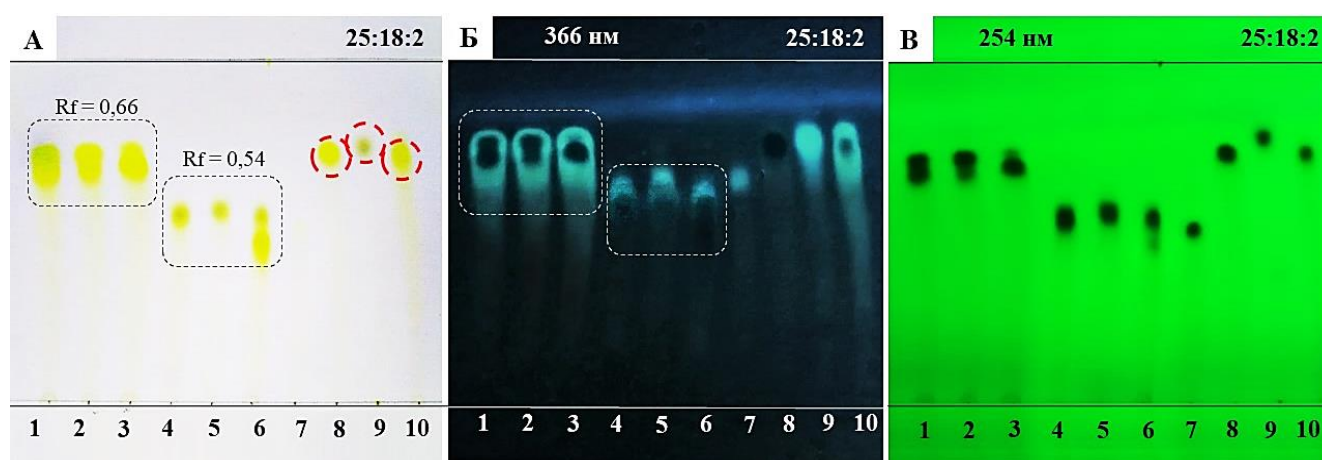


Рисунок 17 – Хроматограмма оценки результатов кислотного гидролиза. А – Детектирование при дневном свете; Б – Детектирование в УФ-свете $\lambda=366$ нм (после обработки спиртовым раствором $AlCl_3$; В – Детектирование в УФ-свете при $\lambda=254$ нм. Обозначения: 1, 2, 3 – вещества астрагалин, афзелин и кверцитрин соответственно до кислотного гидролиза; 4, 5, 6 – вещества астрагалин, афзелин и кверцитрин после проведения кислотного гидролиза соответственно; 7 – СО кверцетрин; 8 – СО лютеолин; 9 – СО кемпферол; 10 – СО кверцетин.

Описание физико-химических свойств для веществ, выделенных их листьев дуба черешчатого и используемых в процессе их идентификации приводятся ниже:

1) **Астрагалин** (3-О- β -D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидроксифлавона) (**1**) Светло-желтое кристаллическое вещество состава $C_{21}H_{20}O_{11}$ с т.пл. 173-176 °C (водный спирт), λ_{max} EtOH 269, 355 нм; + NaOAc 274, 368 нм; + NaOAc + H_3BO_3 272, 356 нм; + $AlCl_3$ и + $AlCl_3$ + HCl 275, 306, 396 нм.

^1H -ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12,61 (с, 1H, 5-OH-группа), 10,21 (1H, с, 7-OH-группа), 9,71 (1H, с, 4'-OH-группа), 8,01 (1H, 2H, д, 9 Гц, H-2¹,6¹), 6,83 (2H, д, 9 Гц, 2H, H-3¹,5¹), 6,43 (1H, д, 2,5 Гц, H-8), 6,17 (1H, д, 2,5 Гц, H-6), (1H, д, 1.5 Гц, H-1'' равнозв.).

^{13}C -ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO- d_6 , δ_C , м.д.): 178.26 (C-4), 164.77 (C-7), 161.81 (C-5), 160.48 (C-9), 157.81 (C-2), 148.89 (C-4'), 134.73 (C-3), 131.42 (C-2' и C-6'), 121.63 (C-1'), 115.98 (C-3' и C-5'), 104.58 (C-10), 102.35 (C-1'' глюкозы), 99.22 (C-6), 94.22 (C-8), 78.03 (C-5''), 76.94 (C-3''), 71.69 (C-2''), 71.69 (C-4''), 61.36 (C-6'').

Масс-спектр астрагалина (HR-ESI-MS, 180 °C, m/z): m/z 449.1078 $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 471.0898 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z 487.0637 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (рис. 18).

Масс-спектр агликона (HR-ESI-MS, 180 °C, m/z): m/z 287.0551 $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 309.0370 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z 325.0313 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (рис. 18).

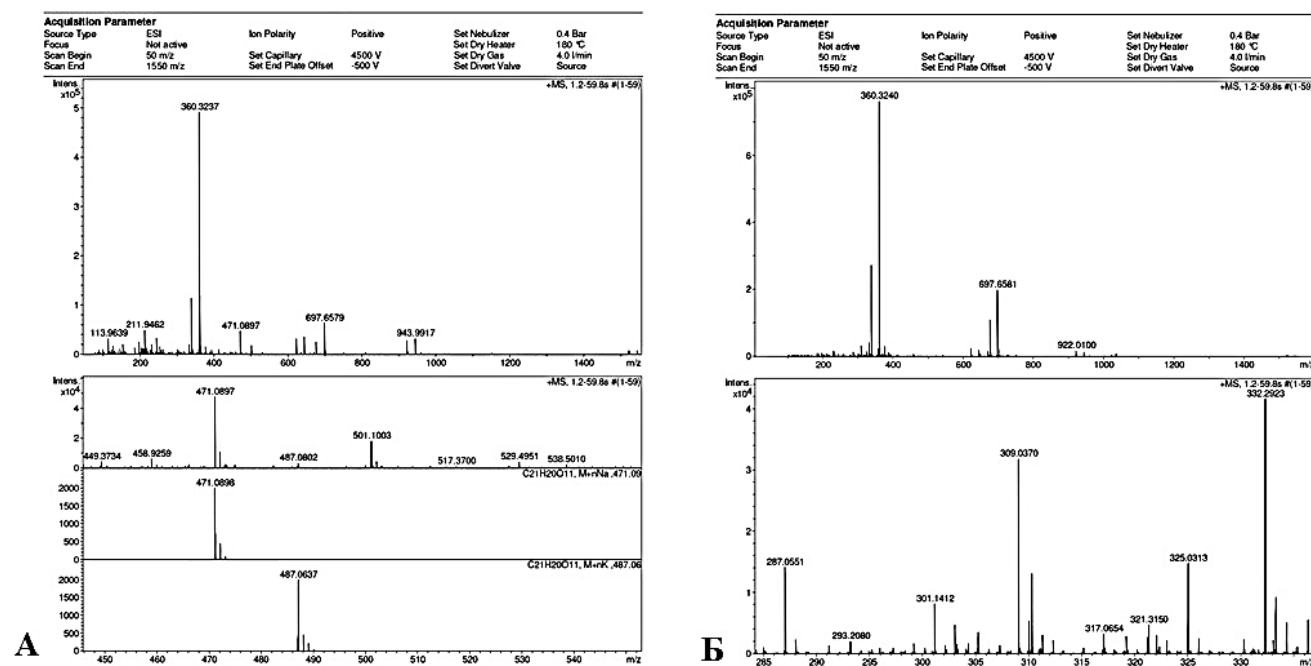


Рисунок 18 – Масс-спектр астрагалина (А) и агликона (Б)

2) **Афзелин** (3-O- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидроксифлавоны) (2)
Светло-желтое кристаллическое вещество состава $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$ с т.пл. 172-173 °C (водный спирт), λ_{max} EtOH 268, 352 нм; + NaOAc 273, 365 нм; + NaOAc + H_3BO_3 272, 366 нм; + AlCl_3 и + AlCl_3 + HCl 276, 305, 397 нм.

^1H -ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12,61 (с, 1H, 5-OH-группа), 10,82 (1H, с, 7-OH-группа), 10,14 (1H, с, 4'-OH-группа), 7,99 (1H, 2H, д, 9 Гц, H-2¹,6¹), 6,85 (2H, д, 9 Гц, 2H, H-3¹,5¹), 6,39 (1H, д, 2,5 Гц, H-8), 6,17 (1H, д, 2,5 Гц, H-6), 5.23 (1H, д, 1.5 Гц, H-1'' рамнозы), 2.8-5.0 (м, 4H рамнозы), 0.78 (3H, д, 6 Гц, CH_3 рамнозы).

Масс-спектр афзелина (HR-ESI-MS, 180 °C, m/z): m/z 455.0948 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

Масс-спектр агликона (HR-ESI-MS, 180 °C, m/z): m/z 287.0550 $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 309.0370 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z 325.0319 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (рис. 19).

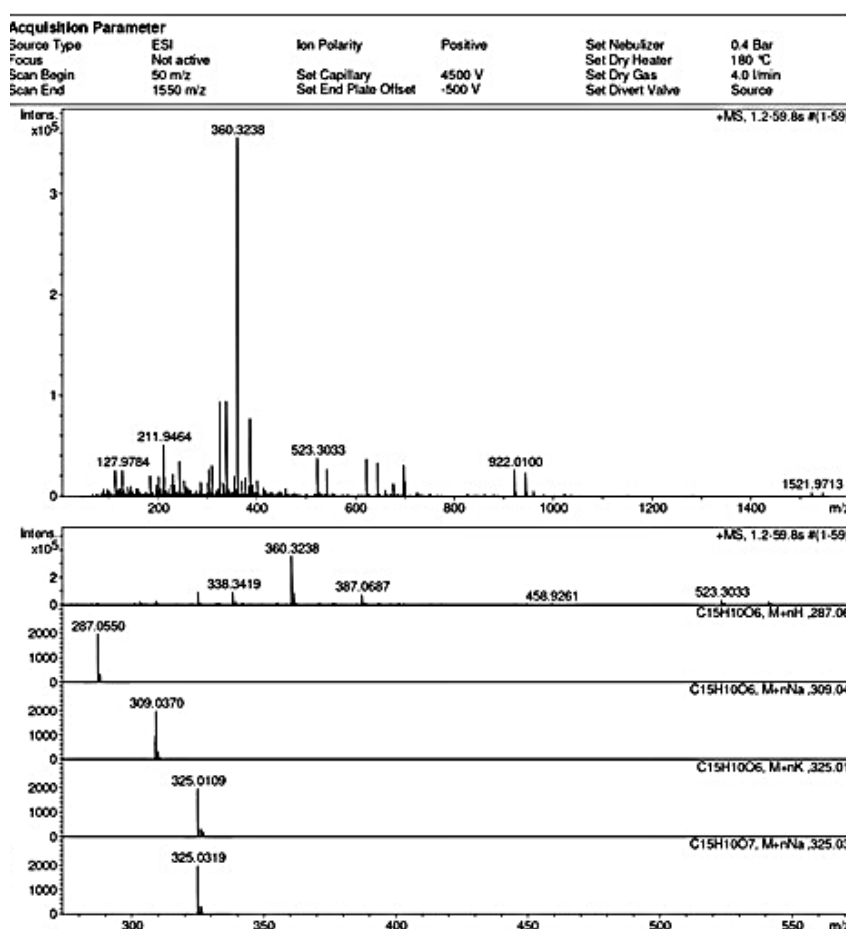


Рисунок 19 – Масс-спектр агликона афзелина (2)

3) **Кверцитрин** (3-O- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона)
 (3) Светло-желтое кристаллическое вещество состава $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ с т.пл. 186-188 °C (водный спирт). λ_{max} EtOH 257, 268пл, 362 нм; + NaOAc 273, 381 нм; + NaOAc + H_3BO_3 262, 379 нм; + AlCl_3 274, 414 нм; + AlCl_3 + HCl 270, 405 нм.

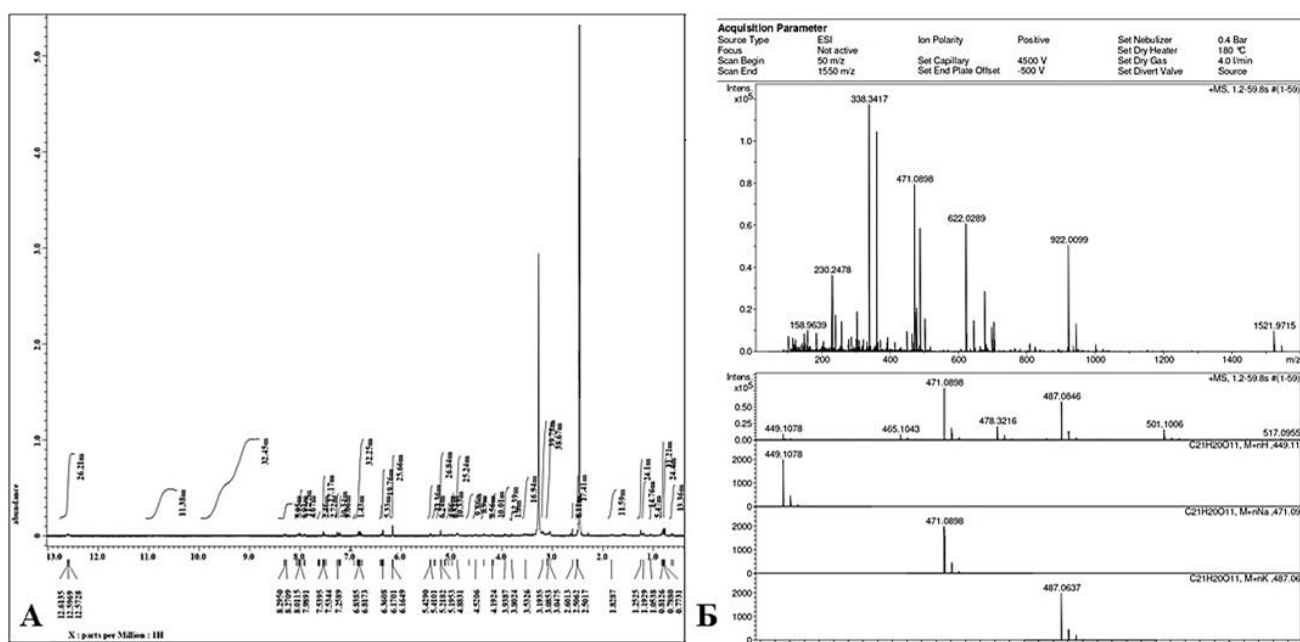
^1H -ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12.61 (1H, с, 5-OH-группа), 10.78 (3H, с, 7-OH-группа), 9.60 (1H, с, 4'-OH-группа), 9.15 (1H, с, 3'-OH-группа), 7.25 (1H, д, $J = 2.5$ Гц, H-2'), 7.14 (1H, дд, $J = 2.5, 9$ Гц, H-6'), 6.81 (1H, д, $J = 9$, H-5'), 6.36 (1H, д, 2.5 Гц, H-8), 6.17 (1H, д, 2.5 Гц, H-6), 5.21 (1H, д, 1.5 Гц, H-1''), 2.8-5.0 (м, 4H рамнозы), 0.81 (3H, д, 6 Гц, CH_3 рамнозы).

^{13}C -ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO- d_6 , δ_{C} , м.д.): 178.27 (C-4), 164.64 (C-7), 161.76 (C-5), 156.90 (C-9), 156.78 (C-2), 148.96 (C-4'), 147.41 (C-3'), 134.74 (C-3), 121.63 (C-1'), 121.43 (C-2'), 116.16 (C-6'), 115.63 (C-5'), 104.54 (C-10), 102.35 (C-1''), 99.21 (C-6), 94.17 (C-8), 71.69 (C-3''), 71.11 (C-5''), 70.58 (C-4''), 70.42 (C-2''), 18.02 (C-6'' рамнозы).

Масс-спектр кверцитрина (HR-ESI-MS, 180 °C, m/z): m/z 449.3734 $[\text{M}+\text{H}]^+$, m/z 471.0897 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z 487.0802 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (рис. 20).

Масс-спектр агликона (HR-ESI-MS, 180 °C, m/z): m/z 325.0319 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ (рис. 20).

^1H -ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12,61 (с, 1H, 5-OH-группа), 10,21 (1H, с, 7-OH-группа), 9,71 (1H, с, 4¹-OH-группа), 8,01 (1H, 2H, д, 9 Гц, H-2¹, 6¹), 6,83 (2H, д, 9 Гц, 2H, H-3¹, 5¹), 6,43 (1H, д, 2,5 Гц, H-8), 6,17 (1H, д, 2,5 Гц, H-6), (1H, д, 1.5 Гц, H-1'' рамнозы) (рис. 20).



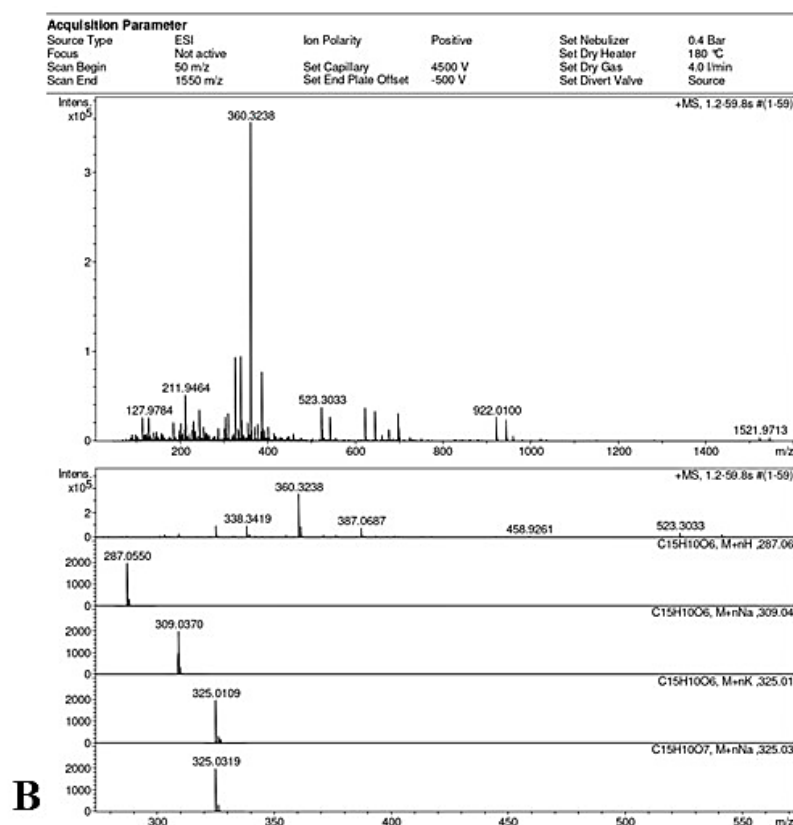


Рисунок 20 – ^1H -ЯМР-спектр кверцитрина (А); Масс-спектр кверцитрина (Б);
Масс-спектр агликона кверцитрина (Б)

4) **Изокверцитрин** (3-О- β -D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона) (4) Светло-желтое кристаллическое вещество состава $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$ с т.пл. 223-225 °С (водный спирт). λ_{max} EtOH 256, 267 пл, 361 нм; + NaOAc 273, 380 нм; + NaOAc + H_3BO_3 262, 378 нм; + A7ICl_3 274, 415 нм; + AlCl_3 + HCl 270, 404 нм.

^1H -ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12,61 (1H, с, 5-ОН-группа), 7,53 (1H, дд, 2,5 и 9 Гц, H-6¹), 7,24 (д, 2,5 Гц, H-2¹), 6,83 (1H, д, 9 Гц, H-5¹), 6,36 (1H, д, 2,5 Гц, H-8), 6,16 (1H, д, 2,5 Гц, H-6), 5,42 (д, 7 Гц, H-1¹¹ глюкозы), 3,0-5,0 (м, 6H глюкозы).

Масс-спектр изокверцитрина (HR-ESI-MS, 180 °C, m/z): m/z 465.1043 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Масс-спектр агликона (HR-ESI-MS, 180 °C, m/z): m/z 325.0319 $[\text{M}+\text{Na}]^+$.

5) **3-О- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона (5)** Светло-желтое аморфное вещество состава $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$. λ_{max} EtOH 257, 267 пл, 361

нм; + NaOAc 272, 380 нм; + NaOAc + H₃BO₃ 263, 377 нм; +AlCl₃ 275, 414 нм; +AlCl₃ + HCl 271, 403 нм.

¹H-ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12,57 (1H, с, 5-OH-группа), 10,81 (1H, с, 7-OH-группа), 10,14 (1H, с, 4¹-OH-группа), 7,26 (1H, дд, 2,5 и 9 Гц, H-6¹), 7,20 (д, 2,5 Гц, H-2¹), 6,83 (1H, д, 9 Гц, H-5¹), 6,35 (1H, д, 2,5 Гц, H-8), 6,17 (1H, д, 2,5 Гц, H-6), 5,21 (уш. с, H-1¹¹ рамнопиранозы), 3,80 (с, 3H, CH₃O), 2,8-5,0 (м, 4H рамнозы), 0,78 (3H, д, 6 Гц, CH₃ рамнозы).

¹³C-ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO-d₆, δ_C, м.д.): 177.98 (C-4), 164.71 (C-7), 161.75 (C-5), 160.48 (C-9), 156.95 (C-2), 148.92 (C-4'), 147.41 (C-3'), 134.73 (C-3), 121.63 (C-1'), 121.24 (C-2'), 116.16 (C-6'), 115.63 (C-5'), 104.58 (C-10), 102.35 (C-1''), 99.22 (C-6), 94.16 (C-8), 71.69 (C-3''), 71.11 (C-5''), 70.86 (C-4''), 70.42 (C-2''), 56,19 (CH₃O), 18.02 (C-6'' рамнозы),

Масс-спектр 3-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона (HR-ESI-MS, 180 °C, *m/z*): *m/z* 501.0003 [M+K]⁺.

Масс-спектр агликона (HR-ESI-MS, 180 °C, *m/z*): *m/z* 317.0654 [M+H]⁺.

6) 3-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона (6)

Светло-желтое кристаллическое вещество состава C₂₂H₂₂O₁₂ с т.пл. 221-223 °C (водный спирт), λ_{max} EtOH 257, 267 пл, 361 нм; + NaOAc 272, 380 нм; + NaOAc + H₃BO₃ 263, 377 нм; +AlCl₃ 275, 414 нм; +AlCl₃ + HCl 271, 403 нм.

¹H-ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12,57 (1H, с, 5-OH-группа), 10,81 (1H, с, 7-OH-группа), 9,74 (1H, с, 4¹-OH-группа), 7,25 (1H, дд, 2,5 и 9 Гц, H-6¹), 7,22 (д, 2,5 Гц, H-2¹), 6,85 (1H, д, 9 Гц, H-5¹), 6,39 (1H, д, 2,5 Гц, H-8), 6,17 (1H, д, 2,5 Гц, H-6), 5,52 (д, 7 Гц, H-1¹¹ глюкозы), 3,80 (с, 3H, CH₃O), 3,1-5,0 (м, 6H глюкозы).

Масс-спектр 3-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,4¹-тетрагидрокси-3¹,-метоксифлавона (HR-ESI-MS, 180 °C, *m/z*): *m/z* 501.0006 [M+Na]⁺.

Масс-спектр агликона (HR-ESI-MS, 180 °C, *m/z*): *m/z* 317.0653 [M+H]⁺.

7) Рамноза (7) Призматические кристаллы белого цвета состава C₆H₁₀O₅ с т.пл. 120-123 °C (водный спирт).

^{13}C -ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO- d_6 , δ_C , м.д.): 74.49 (C-1), 73.31 (C-3), 71.85 (C-5), 69.38 (C-4), 68.87 (C-2), 36.26 (C-6) (рис. 21).

Масс-спектр рамнозы (HR-ESI-MS, 180 °C, m/z): m/z 187.0557 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z 203.0616 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (рис. 21).

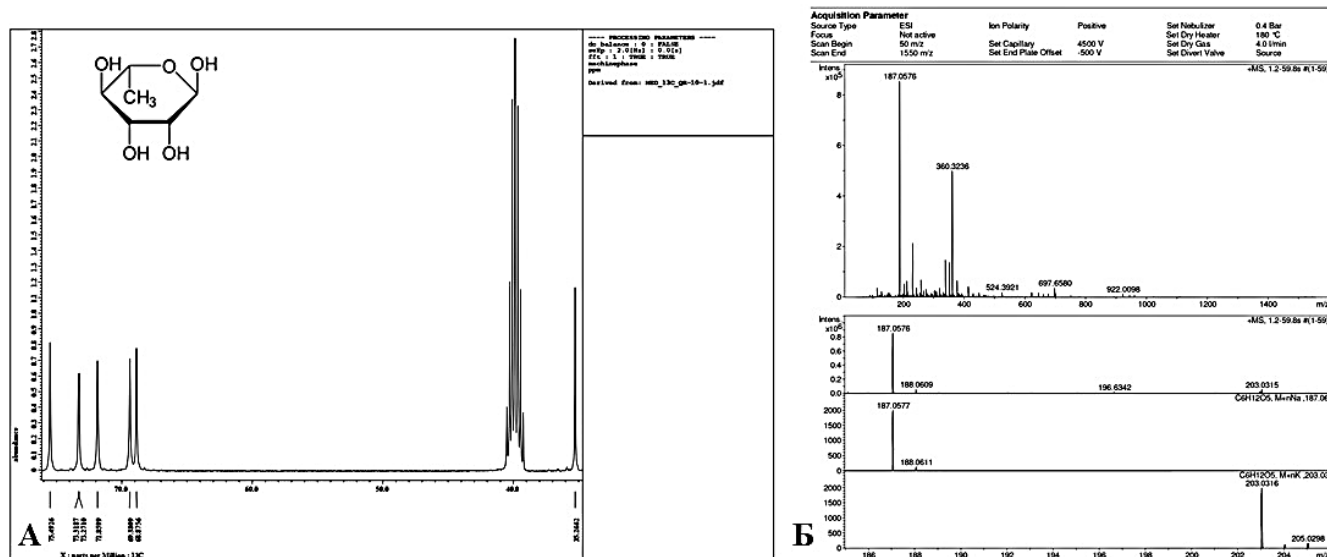


Рисунок 21 – ^{13}C -ЯМР-спектр рамнозы (А); Масс-спектр рамнозы (Б);

Таким образом, проведено исследование химического состава листьев дуба черешчатого методом адсорбционной колоночной хроматографии, в ходе которого выделены вещества флавоноидной природы и установлена их структура.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Впервые из листьев дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) методом адсорбционной колоночной хроматографии были выделены вещества 3-О- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавона, а также моносакхарид рамноза и идентифицированы с использованием методов УФ-, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, а также результатов химических превращений.
2. Впервые выделены в РФ из листьев дуба черешчатого флавоноиды 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 3,5,7,3',4'¹-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.
3. Данные химического состава листьев дуба черешчатого были использованы при разработке методик стандартизации сырья дуба черешчатого и препаратов на его основе, а также при определении числовых показателей.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛИСТЬЕВ, МНОГОЛЕТНЕЙ КОРЫ И ПОЧЕК ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО *QUERCUS ROBUR L.*

Необходимым этапом введения в ГФ РФ новых видов растительного сырья – листьев и почек дуба черешчатого – в ГФ РФ является проведение их стандартизации современными инструментальными методами. В рамках направления фармацевтической стандартизации необходима разработка методик качественного и количественного анализа исследуемых видов сырья [20, 52, 86].

5.1. Разработка методик качественного анализа ЛРС дуба черешчатого

В ходе проведения адсорбционной колоночной хроматографии выделенное диагностически значимое вещество листьев дуба черешчатого – астрагалин, было определено нами как вещество, относящееся к группе фенольных соединений – флавоноидов. Следовательно, для данного вещества применимы качественные реакции, характерные для флавоноидов: реакция с алюминия хлоридом (III), цианидиновая реакция, проба Брианта и др. Помимо цветных реакций также возможным является использование метода ТСХ, УФ-спектрофотометрии и ВЭЖХ метода с применением СО рутин, как близкого по спектральным характеристикам вещества к веществу астрагалину.

Исходя из классического представления о фармакопейном сырье дуба черешчатого как о сырье содержащем дубильные вещества (ДВ), нами были проведены качественные реакции на ДВ с образцами коры, листьев и дуба черешчатого. Результаты цветных реакций представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Результаты цветных реакций изучаемых видов ЛРС на ДВ

Объект	Характер цвета раствора	Группа дубильных веществ	
		Конденсированные	Гидролизуемые
Реакция с 1 % раствором железоммониевых квасцов			
Кора	Черно-синее окрашивание		+

Листья	Черно-зеленое окрашивание	+	
Почки	Черно-синее окрашивание		+
<i>Реакция с 1 % раствором FeCl (III)</i>			
Кора	Темно-синее окрашивание		+
Листья	Темно-зеленое окрашивание	+	
Почки	Темно-синее окрашивание		+
<i>Реакция 1 % раствором ванилина в HCl (конц.)</i>			
Кора	Нет изменения окраски		
Листья	Оранжево-красное окрашивание	+	
Почки	Нет изменения окраски		

В ходе проведения качественного анализа исследуемых видов ЛРС дуба черешчатого методом цветных реакций дана предварительная оценка принадлежности ЛРС к основным группам ДВ: для листьев дуба черешчатого – конденсированные ДВ, для почек и коры дуба черешчатого – гидролизующие ДВ.

5.1.1. Анализ водно-спиртовых извлечений листьев представителей рода *Quercus* L. методом тонкослойной хроматографии

Актуальным направлением современной фармации является расширение сырьевой базы лекарственного растительного сырья, используемого для создания лекарственных препаратов.

Методом ТСХ-анализа изучались водно-спиртовые извлечения листьев следующих видов: дуба черешчатого – *Quercus robur* L.; дуба скального – *Q. petraea* Liebl.; дуба красного – *Q. rubra* L.; дуба летний 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. Разработка методики качественного определения основных групп БАВ в листьях исследуемых видов основан на подборе условий хроматографического разделения веществ и их детектирования.

Проведение сравнительного исследования хроматографических профилей водно-спиртовых извлечений изучаемых видов позволило выявить наличие

веществ рутина и астрагалина во всех изучаемых видах, кроме вещества астрагалина для вида дуба красного *Q. rubra* (рис. 22).

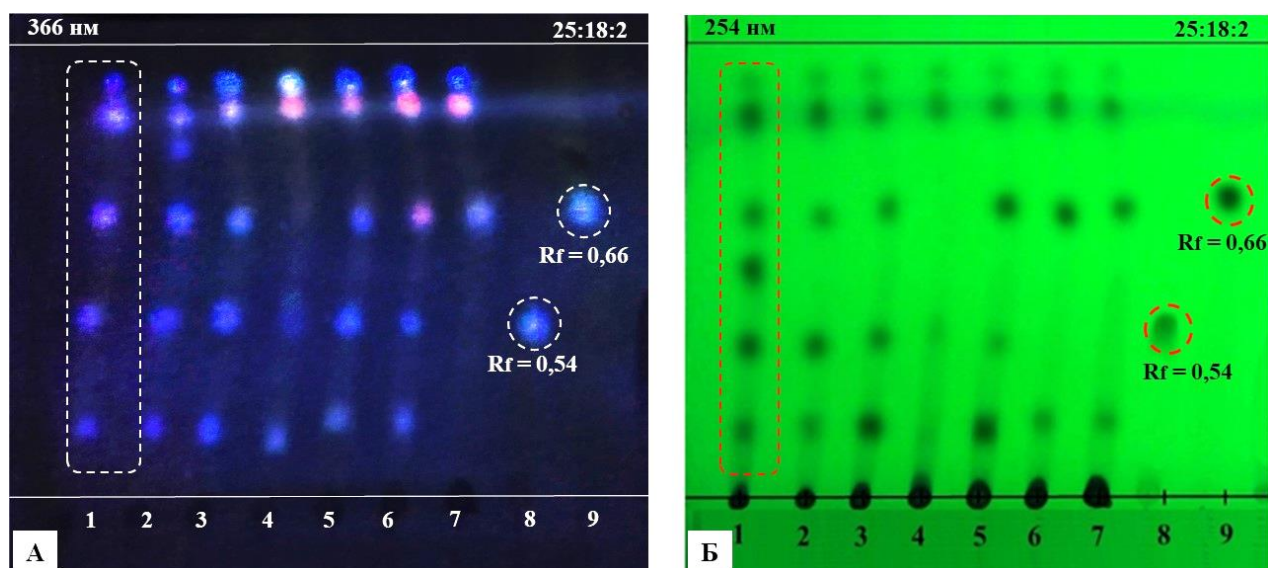


Рисунок 22 – Хроматографические профили растворов водно-спиртовых извлечений из листьев рода *Quercus* на 70 % спирте этиловом в системе растворителей «трихлорметан : спирт этиловый : вода» в соотношении 25:18:2: А – детектирование в УФ-свете при $\lambda=366$ нм, Б – детектирование в УФ-свете при $\lambda=254$ нм. 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.

Экспериментально удалось подобрать оптимальную систему растворителей, состоящую из трихлорметана, спирта этилового и воды очищенной в соотношении «25 : 18 : 2». Астрагалин в данной системе детектируется на хроматограмме в виде зоны адсорбции с R_f около 0,66.

В связи с отсутствием СО астрагалина нами предложено использовать для целей стандартизации СО рутина, как вещества, близкого к астрагалину по структуре и спектральным характеристикам. В указанных условиях хроматографирования значения R_f для астрагалина составило $R_f = 0,66$, для СО рутина – $R_f = 0,54$ (рис. 23).

Проводилась визуальная оценка зон веществ на хроматограмме в различных режимах облучения. После обработки хроматограм спиртовым раствором AlCl_3 отмечалось изменение свечения веществ на хроматограмме на желто-зеленую, что характерно для веществ флавоноидов. Схема полученной хроматограммы представлена на рис. 23. Расчитано значение показателя R_{St} :

$$R_{St}(\text{астрагалина}) = R_f(\text{астрагалина}) (0,66) / R_f(\text{рутина}) (0,54) = 1,22$$

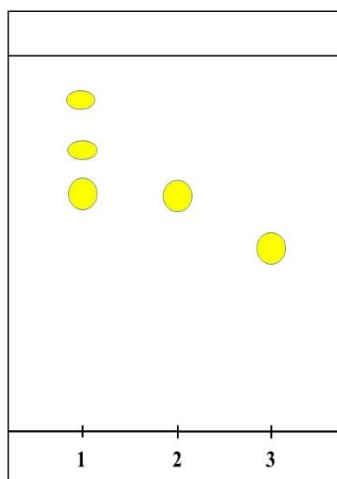


Рисунок 23 – Схема хроматограммы водно-спиртового извлечения из листьев дуба черешчатого. Система «трихлорметан : этанол : вода» в соотношении «25:18:2». Обработка спиртовым раствором алюминия (III) хлорида. Обозначения: 1 – водно-спиртовое извлечение листьев дуба черешчатого; 2 – астрагалин; 3 – СО рутин

Таким образом, метод ТСХ может быть использован в целях установления подлинности водно-спиртовых извлечений листьев дуба черешчатого с использованием вещества астрагалина, а при его отсутствии СО рутин, поскольку данным методом подтверждается наличие этих двух веществ в листьях исследуемых видов рода *Quercus*.

5.1.2. Сравнительное спектрофотометрическое исследование водно-спиртовых извлечений листьев некоторых представителей рода *Quercus* L.

При анализе спектральных кривых водно-спиртовых извлечений листьев методом прямой и дифференциальной спектрофотометрии было обнаружено сходство максимумов поглощения растворов при рабочей длине волны 412 нм, для всех образцов изучаемых видов (см. приложение № 4; рис. 54). Данный максимум поглощения характерен для СО рутина, поэтому при количественной оценке суммы флавоноидов в листьях использовался пересчет на данный флавоноид [51]. В процессе эксперимента использовалась разработанная нами методика (см. раздел 5.2.2.).

Анализируя диаграмму сравнения количественной оценки флавоноидов в листьях дуба некоторых представителей рода *Quercus* L., можно сделать вывод, что общее содержание флавоноидов находится в пределах от 0,97 % до 1,8 %, что представляет интерес в плане обоснования числовых показателей содержания БАВ для сырья данного рода (рис. 24). Результаты метрологической оценки результатов эксперимента представлены в табл. 7.

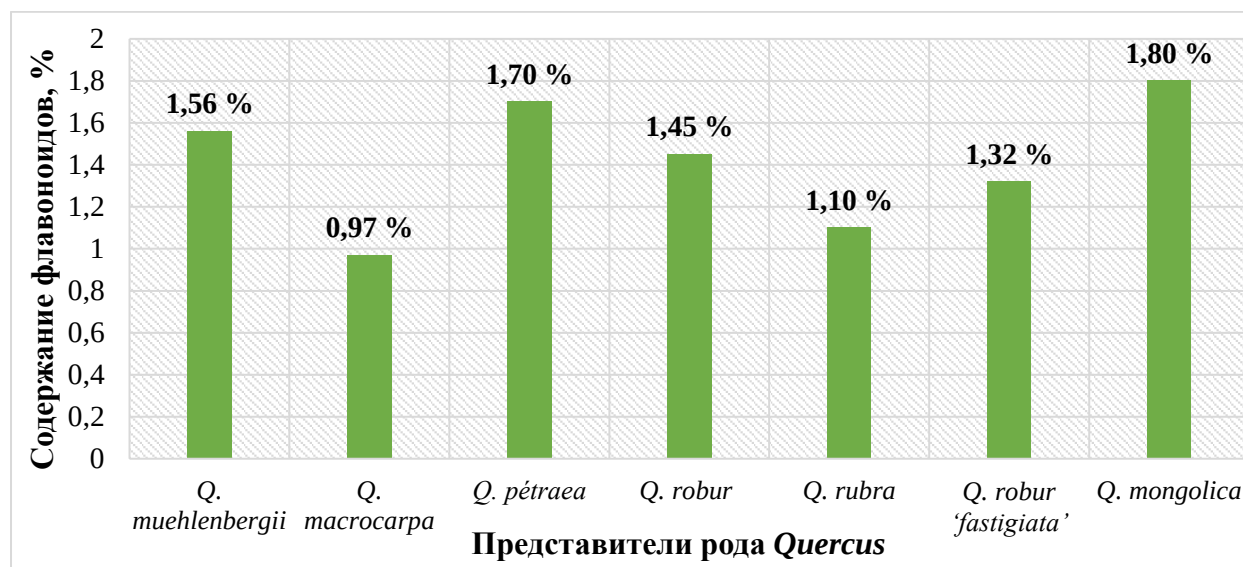


Рисунок 24 – Сравнительная диаграмма содержания флавоноидов в листьях представителей рода *Quercus* L.

Таблица 7 – Метрологическая оценка экспериментальных данных количественного определения суммы флавоноидов в листьях рода *Quercus*

№	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
---	----	----	----	----	----	----	----	----

Показатели метрологической оценки	f	$\bar{X}$	S^2	S	$P, \%$	$t(P, f)$	$\pm X$	$E, \%$
Значение показателя	21	1,42	0,085505	0,2916	95	2,0859	$\pm 0,06082$	2,33

Таким образом, предложен метод дифференциальной УФ-спектрофотометрии для целей качественного анализа листьев некоторых представителей рода *Quercus*: дуба черешчатого, дуба скального, дуба красного, дуба летнего, дуба монгольского, дуба крупноплодного и дуба Мюлленберга. Общее содержание флавоноидов в листьях представленных видов находится в пределах от 0,97 % до 1,8 %.

5.1.3. Качественный анализ водно-спиртовых извлечений листьев дуба черешчатого

Для проведения качественной оценки сырья листьев дуба черешчатого использовался метод прямой и дифференциальной УФ-спектроскопии. Извлечения получали в соответствии с требованиями ГФ РФ [20]. Отбиралась аликвота из полученного извлечения в объеме 2 мл и переносилась в мерную колбу на 25 мл с последующим доведением объема до метки 70% этанолом. Затем измеряли оптическую плотность. Полученные в ходе анализа спектральные кривые имеют следующие характеристики: наблюдается сдвиг спектральной кривой (батохромный), который наблюдается при добавлении 3% спиртового раствора $AlCl_3$ с максимумом поглощения при 406 ± 2 нм, схожие значения характерны для СО рутина [51] (рис. 25). При анализе извлечения методом прямой спектрофотометрии наблюдаются невыраженные максимумы поглощения при 365 ± 2 нм и 406 ± 2 нм. При анализе дифференциальной кривой наблюдаются два выраженных максимума при 318 ± 2 нм и 406 ± 2 нм (рис. 25).

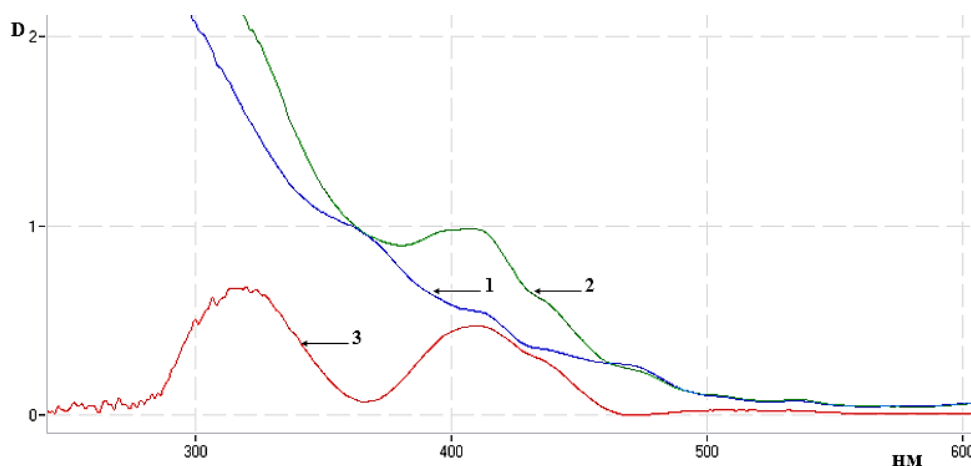


Рисунок 25 – Спектральный профиль извлечения из листьев *Quercus robur* L.
 Обозначения: 1 – спектр извлечения; 2 – электронный спектр извлечения + $AlCl_3$;
 3 – дифференциальный электронный спектр извлечения

5.1.4. Качественный анализ водно-спиртовых извлечений почек дуба черешчатого

Проводился анализ извлечений почек дуба черешчатого, полученных с использованием в качестве экстрагента 40 %, 70 % и 96 % этанола с использованием метода ТСХ в системе «н-бутанол : уксусная кислота : вода» в соотношении «4:1:2», с последующим проявлением пластинки реактивом диазобензолсульфокислотой (ДСК). В результате анализа обнаружены такие вещества как цинарозид, который присутствует в извлечениях почек в концентрациях 70 % и 96 % спирте при $R_f=0,7$. Обнаружены, что ДВ в данных условиях также обнаруживаются на хроматограмме с $R_f=0,8$, что соответствует R_f зоны адсорбции СО кверцетина. Этот факт позволяет предположить присутствие данного вещества в почках дуба черешчатого (рис. 26).

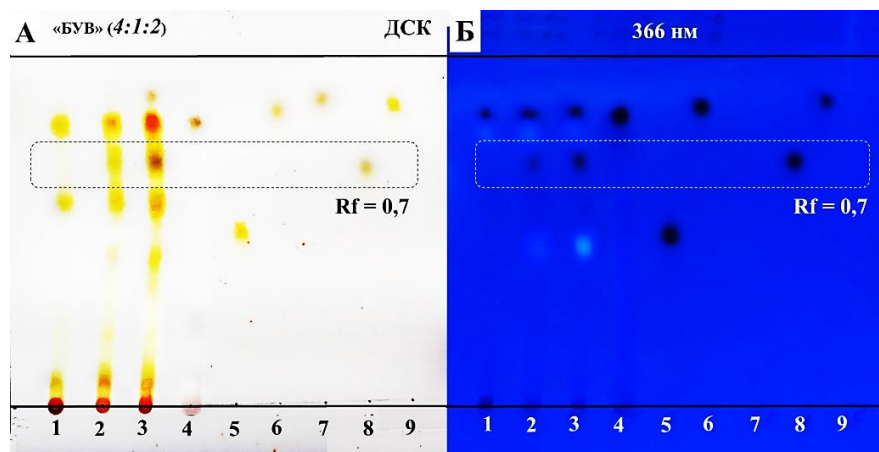


Рисунок 26 – Хроматографические профили растворов водно-спиртовых извлечений из почек дуба черешчатого на 70 % спирте этиловом в системе растворителей «н-бутанол : уксусная кислота : вода» в соотношении «4:1:2»: А – детектирование при дневном свете; Б – детектирование в УФ-свете при $\lambda=366$ нм. Обозначения: 1 – извлечение 40 %; 2 – извлечение 70 %; 3 – извлечение 96 %; 4 – СО танина; 5 – СО рутина; 6 – СО лютеолина; 7 – СО кемпферол; 8 – СО цинарозида; 9 – СО кверцетина.

Для проведения качественной оценки сырья почек дуба черешчатого использовалась методика, аналогичная качественному анализу листьев дуба черешчатого.

Полученные в ходе анализа электронные спектры извлечения почек дуба черешчатого имеют следующие характеристики: наблюдается батохромный сдвиг спектральной кривой, который наблюдается при добавлении 3 % спиртового раствора $AlCl_3$ с максимумом поглощения при 400 ± 2 нм при отсутствии выраженного пика. При анализе дифференциальной кривой наблюдаются три выраженных максимума при 317 ± 2 нм, при 322 ± 2 нм и при 400 ± 2 нм (рис. 27).

Для проведения качественной оценки сырья почек дуба черешчатого использовалась методика, аналогичная качественному анализу листьев дуба черешчатого. Полученные в ходе анализа спектральные кривые имеют следующие характеристики: сдвиг спектральной кривой, который наблюдается при добавлении 3 % спиртового раствора $AlCl_3$ с максимумом при 400 ± 2 нм. При анализе дифференциальной кривой наблюдаются три выраженных максимума при

317±2 нм, при 322±2 нм и при 400±2 нм (рис. 27). В ходе дальнейших исследований полученные данные об особенностях электронных спектров извлечения будут учтены при выполнении количественной оценки БАВ в почках *Quercus robur* L.

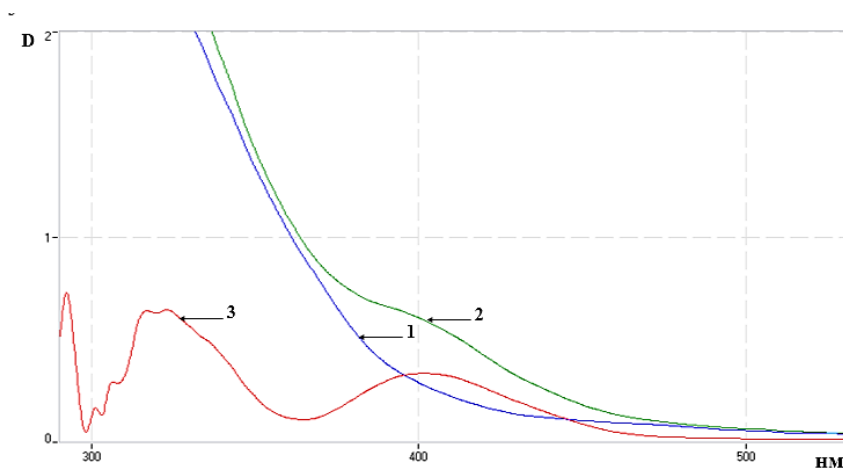


Рисунок 27 – Спектральный профиль извлечения из почек *Quercus robur* L..
Обозначения: 1 – электронный спектр извлечения; 2 – электронный спектр извлечения + AlCl_3 ; 3 – дифференциальный спектр

5.1.5. Качественный анализ спиртовой настойки листьев дуба черешчатого методом ВЭЖХ

Для целей качественной оценки веществ, содержащихся в настойке листьев дуба черешчатого методом ВЭЖХ в качестве подвижной фазы использовалась система «ацетонитрил : вода» в градиентном режиме с использованием следующих соотношений: 6-4 (800 мкл), 4-6 (600 мкл) и 25-75 (1000 мкл) с добавлением 1% ледяной уксусной кислоты от объема воды. В таблице 8 отражены значения времен удерживания пиков основных веществ на ВЭЖХ-хроматограммах настойки листьев дуба черешчатого и времен удерживания пиков выделенных ранее веществ методом адсорбционной колоночной хроматографии, анализируемых в аналогичных с извлечением условиях (рис. 28, 29 и 30). В результате в настойке листьев дуба было идентифицировано 7 веществ (пики 1-7; табл. 8, рис. 28).

Таблица 8 – Значения времени удерживания веществ настойки листьев дуба черешчатого на ВЭЖХ-хроматограмме

№ п/п	Вещество	Номер пика на хроматограмме	Значение времени удерживания на ВЭЖХ-хроматограмме, мин	
			Извлечение из сырья	Индивидуальное вещество
1.	Рутин	1	2,128	3,179
2.	Изокверцитрин	2	4,913	3,977
3.	Кверцитрин	3	5,338	4,218
4.	Астрагалин	4	7,834	6,771
5.	Афзелин	5	12,088	13,176
6.	Кверцетин	6	18,261	18,393
7.	Кемпферол	7	21,222	19,158

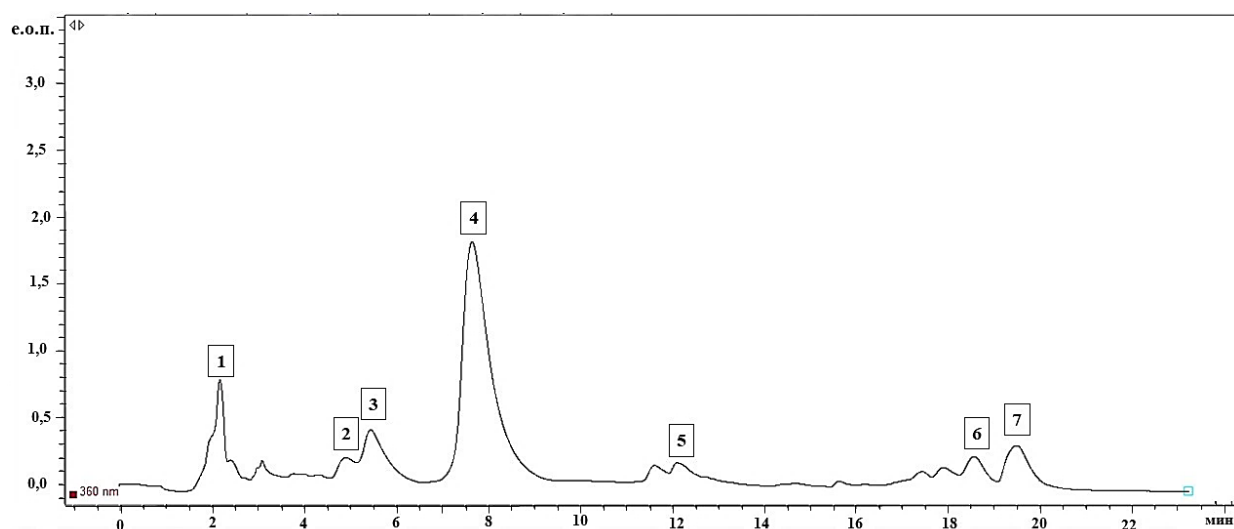


Рисунок 28 – ВЭЖХ-хроматограмма настойки листьев дуба черешчатого.
 Обозначения: 1 – рутин; 2 – изокверцитрин; 3 – кверцитрин; 4 – астрагалин; 5 – афзелин; 6 – кверцетин; 7 – кемпферол.

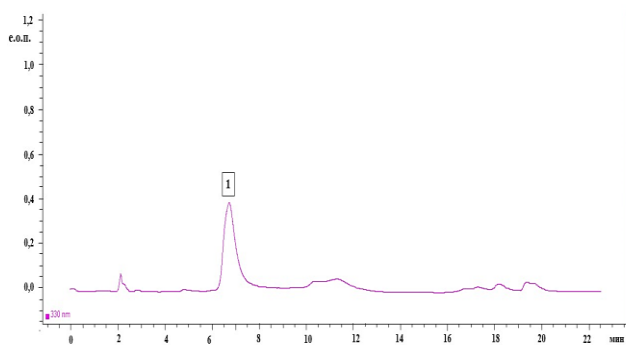


Рисунок 29– ВЭЖХ-хроматограмма астрагалина. Обозначения: 1 – индивидуальное вещество астрагалин.

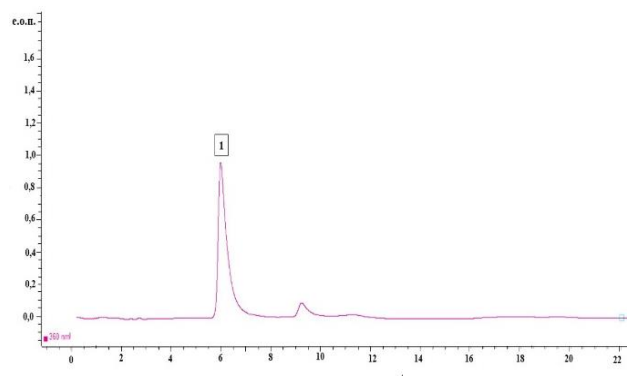


Рисунок 30 – ВЭЖХ-хроматограмма кверцетрина. Обозначения: 1 – индивидуальное вещество кверцитрин.

Присутствие перечисленных веществ подтверждалось путем их добавок к настойке с последующим ВЭЖХ-анализом при аналогичных условиях. В результате чего наблюдалось усиление интенсивности на ВЭЖХ-хроматограмме пиков соответствующих выделенным ранее астрагалину и кверцитрину, а также кверцетину, афзелину, изокверцитрину, кемпферолу и рутину, что позволяет сделать заключение о присутствии этих веществ в настойке листьев дуба черешчатого.

Таким образом, метод ВЭЖХ может быть использован при подтверждении подлинности листьев дуба черешчатого.

5.2. Разработка методик количественного анализа листьев и почек дуба черешчатого

На сегодняшний день для количественного анализа БАВ в лекарственном растительном сырье широко используются метод УФ-спектрофотометрии [9, 63, 86, 101, 122, 151]. Данный метод обладает значительными преимуществами, которые обеспечивают широкое его применение в фармацевтической практике, такие как простота использования, точность, доступность [63, 86, 101, 122].

5.2.1. Разработка методики количественной оценки суммы флавоноидов в листьях *Quercus robur* L.

На сегодняшний день не решен вопрос количественного определения и стандартизации листьев дуба черешчатого. Для внесения листьев дуба черешчатого в российскую Государственную фармакопею, необходимо проведение комплекса фармакогностических исследований, а именно проведение количественного анализа БАВ.

Так как нами в процессе проведения исследования было выделено диагностически значимое вещество (флавоноид астрагалин) листьев дуба черешчатого, то логичным представляется использование данного вещества в качестве рабочего стандарта при разработке нормативной документации и создания методик качественного и количественного анализа сырья. Однако, в виду отсутствия стандартного образца астрагалина, нами проводился пересчет на рутин, как на вещество близкое по спектральным характеристикам к астрагалину.

При проведении исследования были выявлены максимумы поглощения, характерные для веществ группы флавоноидов (рис. 31) [51, 84]. Количественное определение суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого позволило выявить особенности кривых спектров поглощения водно-спиртовых растворов: наблюдается видимый батохромный сдвиг коротковолновой и длинноволновой полосы флавоноидов (рис. 31) [51, 84], что характерно для рутина (рис. 32) [51, 84]. Это позволяет утверждать, что в исследуемом объекте присутствует группа веществ – флавоноидов, однако не обязательно вещество рутин. Во всех исследуемых образцах при любых концентрациях спирта этилового, времени экстрагирования, степени измельчения исследуемого объекта, а также соотношении «сырье : экстрагент», наблюдается схожая картина – максимум поглощения в УФ-спектре приходится на пик при длине волны равной 412 нм (рис. 32; рис. 33), что позволяет нам выбрать рутин в качестве исследуемого стандартного образца [51, 84].

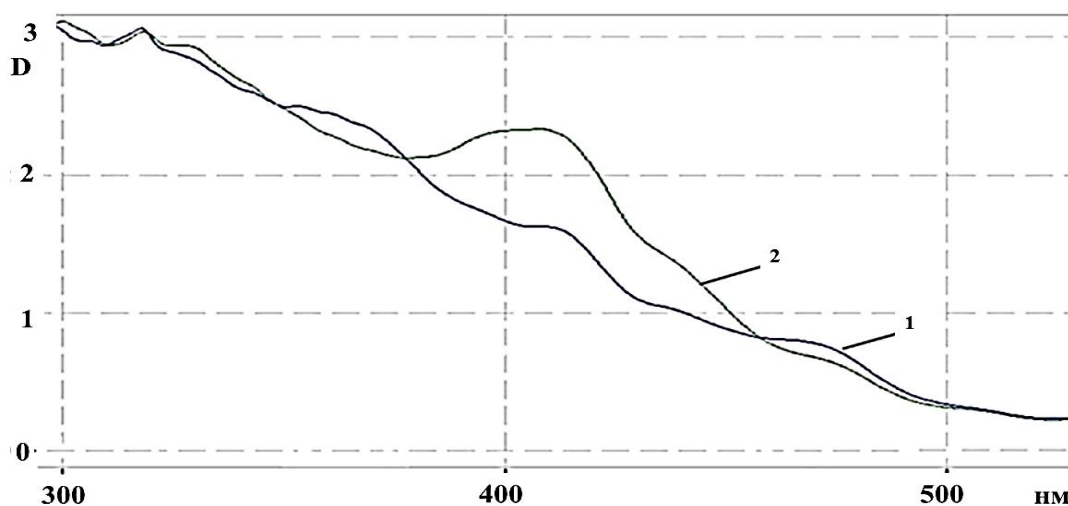


Рисунок 31 – Электронные спектры извлечения из листьев *Quercus robur* L.

Обозначения: 1 – раствор извлечения; 2 – раствор + AlCl_3

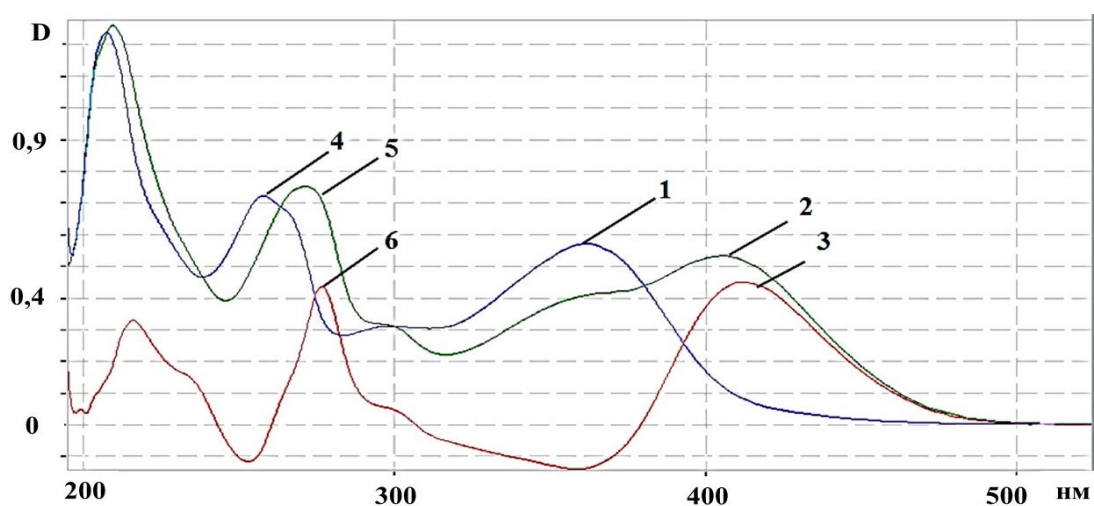


Рисунок 32 – Электронные спектры поглощения раствора рутина. Обозначения: 1 – исходный раствор; 2 – раствор + AlCl_3 ; 3 – дифференциальная спектр; 1,2,3 и 4,5,6 – характерный для рутина батохромный сдвиг коротковолновой и длинноволновой полосы флавоноидов соответственно

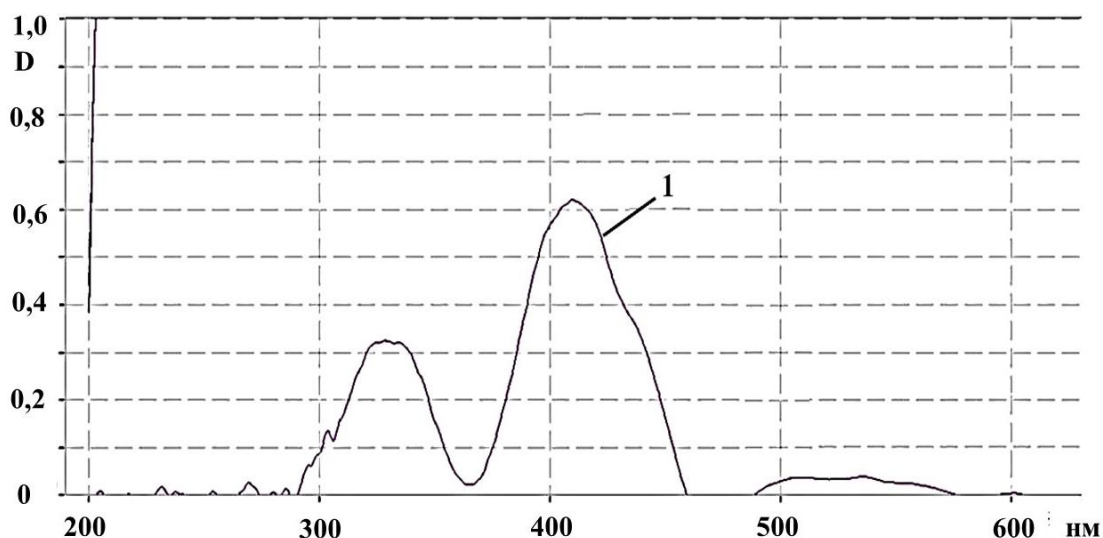


Рисунок 33 – Дифференциальный электронный спектр извлечения листьев *Quercus robur* L. Обозначения: 1 – дифференциальный спектр

В процессе проведения эксперимента были определены оптимальные параметры экстракции флавоноидов из листьев *Quercus robur* L.: экстрагент – 80 % этиловый спирт; «сырьё : экстрагент» – 1:50; время – 30 мин; степень измельчения – 2 мм [84] (табл. 9).

Таблица 9 – Оптимальные параметры экстракции флавоноидов из листьев *Quercus robur* L.

№ п/п	Экстрагент	Соотношение сырьё: экстрагент	Время экстракции, (мин)	Степень измельчения, мм	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырьё (в %)
1	40% этанол	1:50	60 мин	2	0,96±0,011
2	50% этанол	1:50	60 мин	2	1,01±0,001
3	60% этанол	1:50	60 мин	2	1,10±0,011
4	70% этанол	1:50	60 мин	2	1,16±0,013
5	80% этанол	1:50	60 мин	2	1,20±0,013
6	90% этанол	1:50	60 мин	2	1,17±0,013
7	96% этанол	1:50	60 мин	2	1,16±0,013

№ п/ п	Экстрагент	Соотношение сырье: экстрагент	Время экстракции, (мин)	Степень измель- чения, мм	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье (в %)
1	40% этанол	1:50	60 мин	2	0,96±0,011
2	50% этанол	1:50	60 мин	2	1,01±0,001
3	60% этанол	1:50	60 мин	2	1,10±0,011
4	70% этанол	1:50	60 мин	2	1,16±0,013
5	80% этанол	1:50	60 мин	2	1,20±0,013
6	90% этанол	1:50	60 мин	2	1,17±0,013
7	96% этанол	1:50	60 мин	2	1,16±0,013
8	80% этанол	1:50	15 мин	2	1,20±0,013
9	80% этанол	1:50	30 мин	2	1,30±0,014
10	80% этанол	1:50	45 мин	2	1,18±0,013
11	80% этанол	1:50	60 мин	2	0,95±0,010
12	80% этанол	1:50	90 мин	2	0,96±0,011
13	80% этанол	1:50	120 мин	2	0,96±0,011
14	80% этанол	1:20	30 мин	2	0,31±0,003
15	80% этанол	1:30	30 мин	2	0,88±0,010
16	80% этанол	1:50	30 мин	2	1,08±0,012
17	80% этанол	1:50	30 мин	1	1,44±0,016
18	80% этанол	1:50	30 мин	2	1,63±0,005
19	80% этанол	1:50	30 мин	3	1,44±0,016

Методика количественного анализа флавоноидов в листьях *Quercus robur* L. Навеску 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 [84]. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на аналитических весах с точностью до $\pm 0,001$. 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 [84]. 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 [84]. 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 [51, 84].

Примечание: *Приготовление раствора стандартного образца – 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). Определяют 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) [51, 84].

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

$$X = \frac{Dx \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 2 \cdot 50 \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где Dx – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора СО рутина;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса СО рутина, г;

W – потеря в массе при высушивании в процентах.

В случае отсутствия СО рутин предлагается использовать теоретическое значение $E_{1\text{см}}^{1\%} = 240$.

$$x = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{m \cdot 240 \cdot 2 \cdot (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, г;

240 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) СО рутин при 412 нм;

W – потеря в массе при высушивании в процентах.

В процессе выполнения метрологической оценки эксперимента (табл. 10) определена ошибка единичного определения Σ флавоноидов в листьях *Quercus robur* L., которая при доверительной вероятности в 95 % составляет $\pm 0,32$ % [84] (табл. 10).

Таблица 10 – Метрологическая оценка полученных результатов

№ 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	1,635455	0,000307	0,017529	95	2,113	0,005285	0,32

Проведена валидационная оценка методики по пунктам требований ГФ РФ: специфичность, линейность, правильность и воспроизводимость. При оценке специфичности методики определялась соотношение (соответствие) максимумов поглощения комплекса флавоноидов листьев *Quercus robur* L. и СО рутин с AlCl_3 . 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, можно сделать вывод о перспективности листьев *Quercus robur* L., с максимальным значением содержания суммы флавоноидов по результатам разработанной методики – 1,63 %) [51]. Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 0,32$ %. В качестве нижнего предела предлагается нормируемый показатель содержания суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого не менее 0,30 %. Целесообразным также является подход, предусматривающий использование астрагалина ($E_{1\text{см}}^{1\%}$ 300), являющегося диагностически значимым флавоноидом сырья данного растения [51]. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в почках дуба черешчатого

Помимо коры и листьев дуба черешчатого, интерес представляют почки данного растения, химический состав которых на данный момент не изучен [10, 20]. Важным направлением изучения в рамках настоящего исследования, является решение вопросов стандартизации, а также разработка методов количественного анализа, содержащихся в сырье БАВ [7, 45, 66, 102, 104].

Исследовались три образца почек дуба черешчатого *Quercus robur* L., заготовленные в зимне-весенний период с конца февраля по начало апреля 2021 г. на территории Самарской области. Для анализа отбирались как вегетативные, так и генеративные почки с трех представителей данного вида. После сбора почки подвергались сушке в сухом месте. Для разработки методики использовался метод дифференциальной спектрофотометрии, который проводился в соответствии с Фармакопейной статьей Государственной Фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) [20].

Получение водно-спиртового извлечения из почек *Quercus robur* L.

Исследуемый образец сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (т. н.) помещают в колбу со шлифом на 100 мл, затем прибавляют 50 мл 70 % этанола.

После этого колбу закрывают пробкой и взвешивают на аналитических весах с точностью до $\pm 0,001$. Затем колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 2 ч. Затем колбу охлаждают в течение 30-40 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и доливают в колбу испарившийся экстрагент до изначальной массы колбы. Затем извлечение фильтруют, используя бумажный фильтр [83].

Приготовление испытуемого раствора. Около 5 мл полученного извлечения переносят в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 1 мл 3 % спиртового раствора AlCl_3 с доведением раствора 96 % этанолом до метки (испытуемый «раствор А»), затем перемешивают и оставляют на 40 минут (в целях образования комплекса флавоноидов с AlCl_3). Затем измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 400 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор, полученный следующим образом: 5 мл извлечения (1:50) помещают в мерную колбу на 25 мл с последующим доведением раствора до метки 96 % этанолом [83].

Приготовление раствора стандартного образца цинарозида. Около 0,01 г (т. н.) СО цинарозида помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют 70 % этанолом при нагревании на водяной бане. После полного растворения СО колбу охлаждают до комнатной температуры, с последующим доведением объема колбы до метки 70 % этанолом («раствор А» цинарозида). Из полученного раствора СО отбирают аликвоту 2 мл «раствора А» СО цинарозида и затем помещают в мерную колбу на 25 мл, затем прибавляют 1 мл 3 % спиртового раствора AlCl_3 и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (испытуемый «раствор Б» цинарозида). Измеряют оптическую плотность «раствора Б» на спектрофотометре при длине волны 400 нм [83].

Приготовление раствора сравнения. Отобранную аликвоту в объеме 2 мл «раствора А» СО цинарозида переносят в мерную колбу на 25 мл, затем доводят объем раствора до метки 96 % этанолом (раствор «сравнения Б» цинарозида) [83].

Предлагается формула для количественной оценки Σ флавоноидов в почках дуба, исходя из пересчета на СО цинарозид и абсолютно сухое сырье в процентах (X):

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 5 \cdot 25 \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где: D – оптическая плотность испытуемого раствора; D_0 – оптическая плотность раствора СО цинарозида; m – масса сырья, г; m_0 – масса СО цинарозида, г; W – потеря в массе при высушивании в процентах.

В случае отсутствия СО цинарозида предлагается использовать значение $E_{1\text{см}}^{1\%}$ равное 334.

$$X = \frac{D \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{m \cdot 334 \cdot 5 \cdot (100 - W)},$$

где: D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса сырья, г; ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) СО цинарозида при 400 нм – 334; W – потеря в массе (при высушивании).

Валидация аналитической методики. Оценивались следующие показатели: специфичность, линейность, прецизионность (уровень повторяемости), внутрилабораторная прецизионность, правильность в соответствии с нормами ГФ РФ XIV издания.

В процессе выполнения эксперимента предложена методика количественной оценки Σ БАВ флавоноидов в почках дуба черешчатого, в результате чего определены оптимальные условия экстрагирования и обоснован выбор оптимального экстрагента.

Так как на данный момент компонентный состав почек не изучен, нами при разработке методики определялась сумма веществ (флавоноидов) в исследуемых извлечениях.

Разработка методики проводилась поэтапно. На первом этапе были изучены спектры поглощения водно-спиртовых извлечений на основе почек дуба

черешчатого. В ходе анализа полученных извлечений методом дифференциальной спектрофотометрии были определены максимумы поглощения спектральных кривых, характерных для веществ флавоноидной природы (рис. 34). Наблюдался bathochromный сдвиг электронного спектра поглощения водно-спиртового извлечения почек дуба черешчатого с максимальной точкой пика, схожей с раствором СО цинарозида (400 нм) (рис. 35). Исходя из этого, нами было выбрано вещество цинарозид в качестве СО (рис. 36; рис. 37). Наблюдаемая схожая картина спектральных кривых поглощения при анализе исследуемых образцов сырья и раствора стандартного образца цинарозида позволяет утверждать, что в водно-спиртовых извлечениях почек дуба черешчатого присутствуют флавоноиды, а метод дифференциальной спектрофотометрии позволяет провести их количественное определение [83].

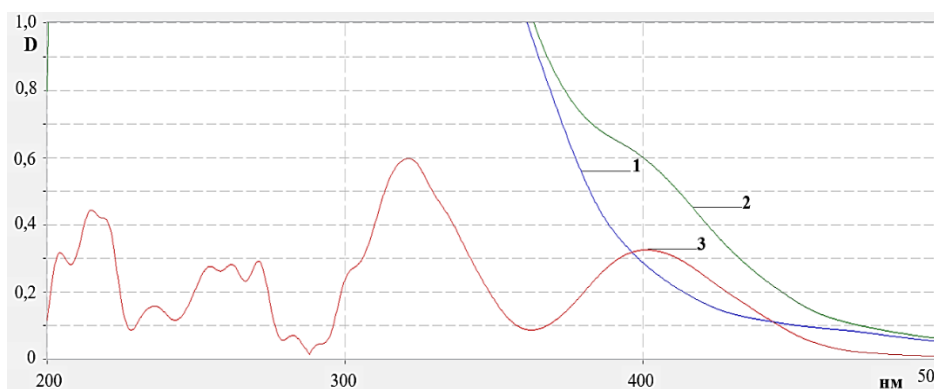


Рисунок 34 – Электронные спектры извлечения почек *Quercus robur* L.

Обозначения: 1 – исходный раствор извлечения; 2 – раствор извлечения + $AlCl_3$;

3 – дифференциальный спектр.

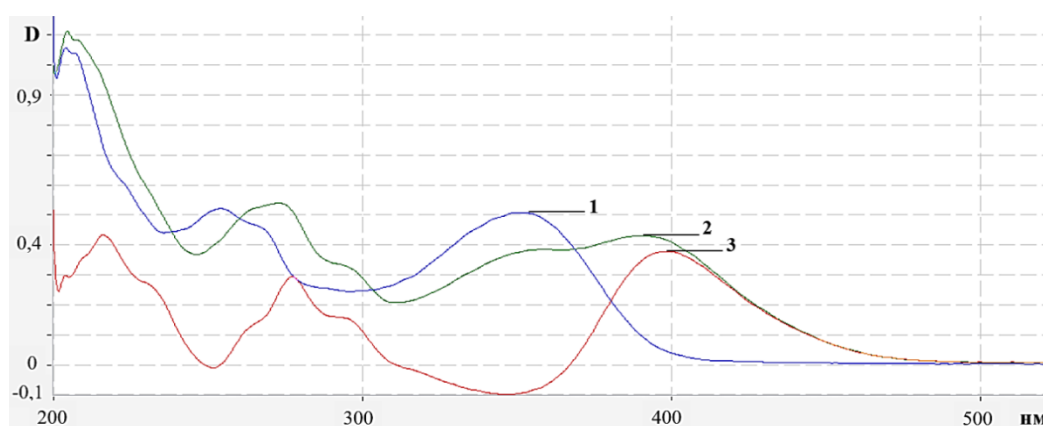


Рисунок 35 – Электронные спектры СО цинарозида. Обозначения: 1 – раствор цинарозида; 2 – раствор цинарозида + $AlCl_3$; 3 – дифференциальный спектр

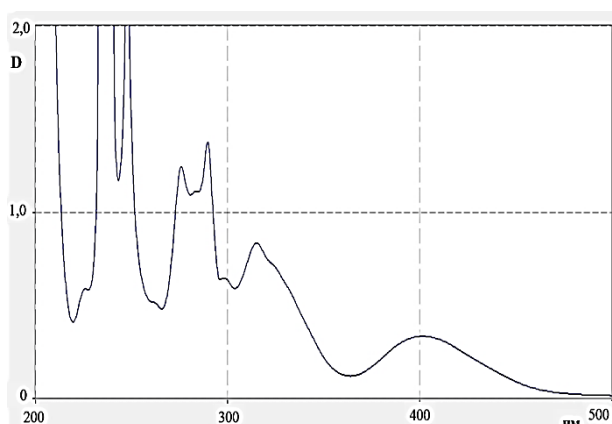


Рисунок 36 – Дифференциальный электронный спектр извлечения почек *Quercus robur* L.

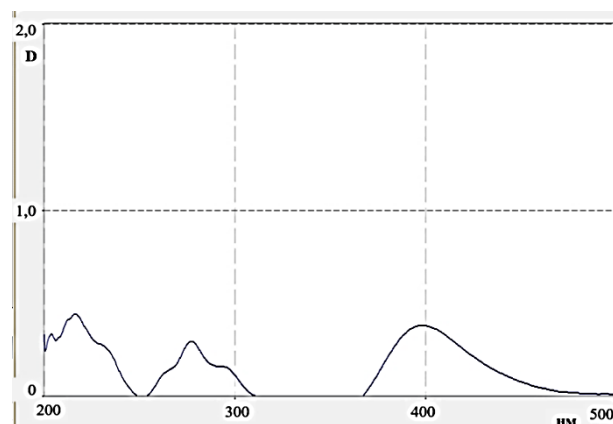


Рисунок 37 – Дифференциальный электронный спектр раствора СО цинарозида

На втором этапе разработки методики экспериментально определен оптимальный экстрагент – 70 % этанол. Следующим этапом было проведение эксперимента по определению оптимального соотношения «сырье-экстрагент» (1:50). Затем были определены временные параметры экстракции, обнаружено, что в течение 120 минут происходит максимальное извлечение флавоноидов из сырья. Заключительным этапом являлось определение степени измельчения сырья (2 мм), при которой используемый экстрагент максимально извлекает флавоноиды из сырья (табл. 11) [83].

Таблица 11 – Оптимальные показатели экстрагирования суммы флавоноидов из почек *Quercus robur* L. (длина волны 400 нм)

№ п/п	Экстрагент	Соотноше ние «сырье: экстраген т»	Время экстракц ии, мин	Степень измель- чения, мм	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид и абсолютно сухое сырье, %
1	40% этанол	1:30	60 мин	2	0,23±0,012
2	50% этанол	1:30	60 мин	2	0,24±0,012
3	60% этанол	1:30	60 мин	2	0,24±0,012
4	70% этанол	1:30	60 мин	2	0,25±0,013
5	80% этанол	1:30	60 мин	2	0,24±0,012
6	90% этанол	1:30	60 мин	2	0,22±0,011
7	96% этанол	1:30	60 мин	2	0,23±0,012
8	70% этанол	1:30	30 мин	2	0,20±0,01
9	70% этанол	1:30	45 мин	2	0,21±0,01
10	70% этанол	1:30	60 мин	2	0,23±0,012
11	70% этанол	1:30	90 мин	2	0,23±0,012
12	70% этанол	1:30	120 мин	2	0,26±0,013
13	70% этанол	1:30	150 мин	2	0,25±0,013
14	70% этанол	1:20	120 мин	2	0,14±0,01
15	70% этанол	1:30	120 мин	2	0,16±0,01
16	70% этанол	1:50	120 мин	2	0,27±0,012
17	70% этанол	1:100	120 мин	2	0,26±0,013
18	70% этанол	1:50	120 мин	1	0,23±0,001
19	70% этанол	1:50	120 мин	2	0,27±0,004
20	70% этанол	1:50	120 мин	3	0,23±0,001

На основании полученных результатов определены условия методики количественного спектрофотометрического определения: экстракция флавоноидов из почек дуба черешчатого, измельченных до 2 мм; экстрагент - 70 % этанол; соотношение «сырье-экстрагент» – 1:50; время анализа 120 мин; длина волны 400 нм; СО или значения $E_{1\text{см}}^{1\%}$ СО цинарозида (334) [83].

Валидацию методики проводили в соответствии с ГФ РФ XIV издания [20] (табл. 12), в ходе которой определялась специфичность разработанной методики, исходя из соответствия максимумов поглощения комплекса флавоноидов почек дуба черешчатого и раствора СО цинарозида с алюминием хлоридом и дифференциального пика СО цинарозида.

Для оценки линейности разработанной методики использовали серию из 10 растворов СО цинарозида (с концентрациями в диапазоне от 0,00225 до 0,0225 мг/мл: 0,00225; 0,00325; 0,00425; 0,00525; 0,00625; 0,00725; 0,00825; 0,00925; 0,0125; 0,0225) с AlCl_3 при рабочей длине волны 400 нм (табл. 13). На основании полученных данных строили график зависимости значений оптической плотности растворов цинарозида с алюминия хлоридом от концентрации цинарозида и затем рассчитывали уравнение линейной регрессии (рис. 38; табл. 12).

При изучении линейной зависимости вида $y = bx + a$, коэффициент корреляции составил 0,999783, следовательно, данную методику можно использовать для анализа суммы флавоноидов в почках дуба черешчатого в пересчете на цинарозид в указанном диапазоне концентраций (рис. 38; табл. 12) [83].

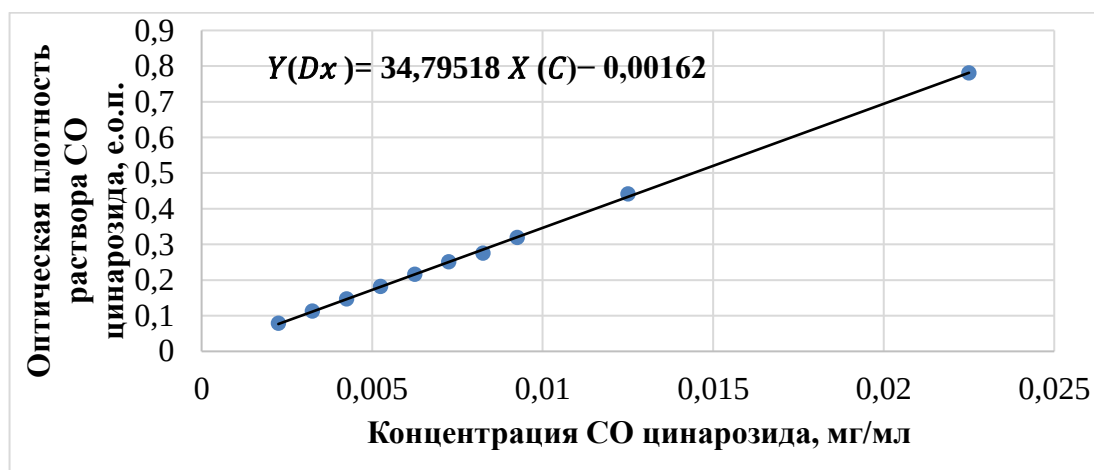


Рисунок 38 – Зависимость значений оптической плотности растворов цинарозида с алюминия хлоридом от концентрации цинарозида (дифференциальный вариант)

Таблица 12 – Статистическая оценка параметров линейной зависимости

1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.
f	$\bar{x}$	$\bar{y}$	b	a	$t(P, f)$ при $P, \%$	Δb	Δa	S_0^2	r
9	0,008100	0,280223	34,79518	-0,00162	0,6404	0,004541	0,003921	0,042092	0,999 783

Таблица 13 – Исходные данные для оценки линейности методики

№ п/п	Концентрация раствора стандартного образца цинарозида, мг/мл	Значение оптической плотности, е.о.п. (среднее значение из трех последовательных измерений)
1.	0,00225	0,078411
2.	0,00325	0,112547
3.	0,00425	0,146935
4.	0,00525	0,181541
5.	0,00625	0,216048
6.	0,00725	0,250947
7.	0,00825	0,275401
8.	0,00925	0,318974
9.	0,0125	0,440864
10.	0,0225	0,780564

Прецизионность методики (уровень повторяемости) оценивали путем анализа исследуемого образца ЛРС в 10-кратной повторности (табл. 14).

Таблица 14 – Метрологическая оценка прецизионности методики (уровень повторяемости)

№ 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 почек дуба	10	0,267273	0,000222	0,014894	95	1,152	0,004491	1,68

Для оценки внутрилабораторной прецизионности анализ испытуемого образца проводился другим аналитиком в другие дни с использованием того же оборудования (табл. 15). Для каждого образца проводились исследования в количестве шести повторностей. Расчетное значение F-критерия Фишера 1,19 меньше табличной величины 5,05. Следовательно, дисперсии результатов анализа обоих химиков статистически эквивалентны и различия между полученными значениями являются случайными. Таким образом, разработанная методика

соответствует требованиям валидации по показателю внутрилабораторная прецизионность [83].

Таблица 15 – Валидационная оценка внутрилабораторной прецизионности методики определения суммы флавоноидов в почках дуба черешчатого

№ п/п	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Показатели метрологической оценки	f	$\bar{X}$	S^2	S	$P, \%$	$t(P, f)$	$\pm x$	$\varepsilon, \%$
Аналитик 1	5	0,238333	0,000057	0,007528	95	2,1547	0,003073	1,28
Аналитик 2	5	0,250000	0,000080	0,008944	95	2,3174	0,003651	1,46

Примечания: $t_{\text{выч}} = 2,21$; $2,31 < t_{\text{табл}}(95 \%; 5; 5)$; $F_{\text{выч}} = 1,19 < F(95 \%; 5; 5)$.

Для целей определения правильности данной методики применялся метод добавок. Готовились растворы СО цинарозида с известной концентрацией (80 %, 100 % и 120 %), которые добавляли к отобранной аликвоте исследуемого образца. Средний процент открываемости составил $100,30 \pm 2,12 \%$ (табл. 16 и 17). Для каждой концентрации проводили по три определения. Погрешность, определяемая для проб с добавками стандартных образцов, находилась в пределах погрешности единичного определения, что позволяет сделать вывод об отсутствии систематической погрешности. Величина среднего процента открываемости эксперимента $100,30 \pm 2,12 \%$ укладывается в нормируемый диапазон значений и находится в пределах $100 \pm 5 \%$ (табл. 16 и табл. 17) [83].

Таблица 16 – Схема приготовления водно-спиртовых извлечений почек *Quercus robur* L. с добавками растворов СО цинарозида

Исходное содержание цинарозида, мг/мл водно-спиртового извлечения	Добавка цинарозида, мг/мл	Суммарное расчетное содержание цинарозида, мг/мл	Уровень концентрации относительно номинального, %
2,30	1,84	4,14	80
2,30	2,30	4,60	100
2,30	2,76	5,06	120

Таблица 17 – Оценка правильности методики количественного определения Σ флавоноидов в почках *Quercus robur* L.

Внесено цинарозида, мг/мл	Найдено, мг/мл	Открываемость, %
0,84	0,80	95,24
0,84	0,86	102,38
0,84	0,83	98,81
2,30	2,32	100,87
2,30	2,26	98,26
2,30	2,38	103,48
2,76	2,81	101,81
2,76	2,72	98,55
2,76	2,85	103,26

Полученные результаты говорят об удовлетворительной прецизионности методики на уровнях повторяемости и внутрिलाбораторной прецизионности.

Установлено, что в среднем общая суммарного количества флавоноидов в исследуемом образце сырья составляет $0,24 \pm 0,012$ %.

Таким образом, исходя из результатов валидационной оценки результатов эксперимента, можно сделать вывод о пригодности использования данной методики для количественной оценки суммарного количества флавоноидов в пересчете на СО цинарозид.

Данной методикой нами было проанализировано три образца почек *Quercus robur* L., собранных в период – май-июнь 2021-го года (табл. 18). Установлены пределы содержания суммарного количества флавоноидов в анализируемых образцах: от $0,27 \% \pm 0,004$ до $0,44 \% \pm 0,02$ в зависимости от места произрастания (табл. 18).

Таблица 18 – Оценка суммарного количества флавоноидов в образцах почек *Quercus robur* L., различающихся по месту сбора

№ п/п	Место сбора сырья	Содержание суммы флавоноидов в почках <i>Quercus robur</i> L. в абсолютно сухом сырье (в %) в пересчете на цинарозид
1.	Самарская область, Похвистневский р-н, с. Первомайск (март 2021 г.)	$0,27 \pm 0,01$
2.	Ботанический сад Самарского университета, г. Самара (март 2021 г.)	$0,44 \pm 0,02$
3.	Природный лесопарк «Дубки», г. Самара (март 2021 г.)	$0,35 \pm 0,02$

По итогам выполненного эксперимента была разработана методика количественного анализа суммы флавоноидов в почках *Quercus robur* L. спектрофотометрическим методом (СО цинарозид; длина волны 400 нм; пределы содержания флавоноидов: от $0,27 \% \pm 0,004$ до $0,44 \% \pm 0,02$; погрешность единичного определения составила $\pm 1,68 \%$; нижний предел содержания флавоноидов – не менее 0,25 %) [83].

Полученные результаты способствуют разработке нормативной документации на перспективный вид сырья «Дуба черешчатого почки».

5.2.2. Сравнительное количественное определение стериннов в коре дуба черешчатого *Quercus robur* L.

Известно, что в коре дуба черешчатого содержатся простые фенольные соединения, дубильные вещества, флавоноиды, относящиеся к группе полярных и относительно гидрофильных веществ, входящих в состав лекарственной формы – отвар [165]. Что объясняется особенностью применения данного вида сырья. В научной литературе также имеются данные и о веществах липофильной природы коры дуба, в частности, стеринных соединений [10, 50, 90, 114, 124, 153, 158, 160, 168]. Изучение данной группы веществ представляется интересным в плане поиска новых способов стандартизации коры дуба. Данный аспект исследовательской

работы проводится в рамках направления ресурсосбережения и разработки подходов безотходного производства, поскольку многолетняя кора дуба может использоваться в качестве доступного источника веществ стеринами природы.

Изучалась многолетняя кора дуба черешчатого со стволов и крупных веток, полученная от деревоперерабатывающей компании «ДУО», расположенной на территории г. Самара в сравнении с фармакопейным образцом коры дуба черешчатого, производство АО «Красногорсклексредства».

В качестве метода определения суммы стеринами соединений использовали спектрофотометрический анализ в пересчете на СО ситостерин по ранее описанной методике для травы крапивы двудомной [3, 4, 76].

Особенностью используемого метода является изучение спектральных характеристик извлечённой суммы веществ в среде концентрированной серной кислоты. Взаимодействие стеринами соединений с серной кислотой позволяет селективно определять данную группу веществ [16].

Анализ спектральных характеристик поглощения образцов коры дуба показал относительное сходство спектральных профилей сравниваемых объектов (рис. 39, рис. 40).

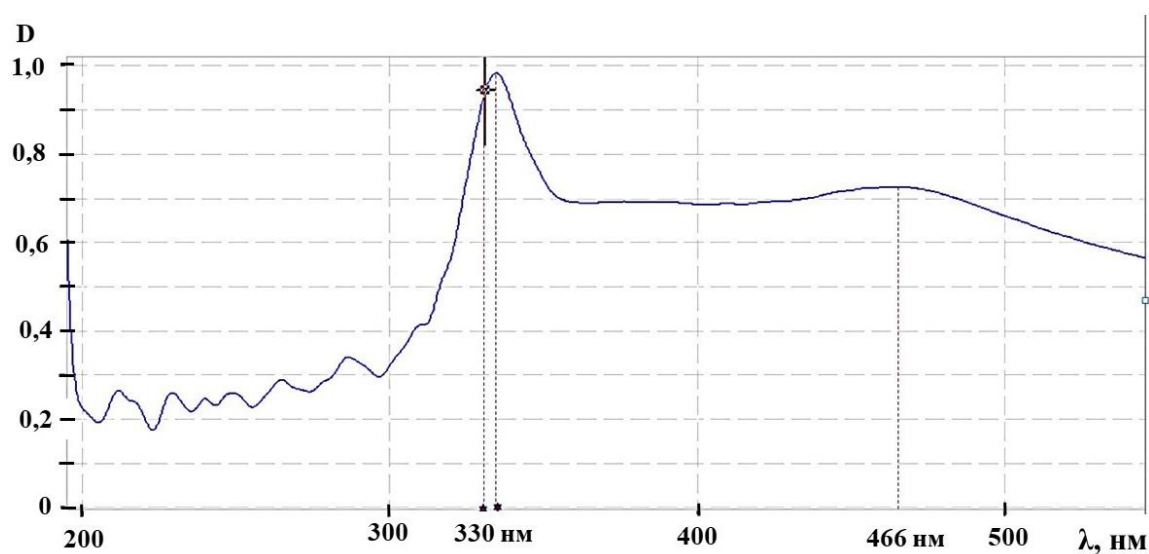


Рисунок 39— Профиль электронного спектра поглощения извлечения фармакопейного образца коры дуба черешчатого

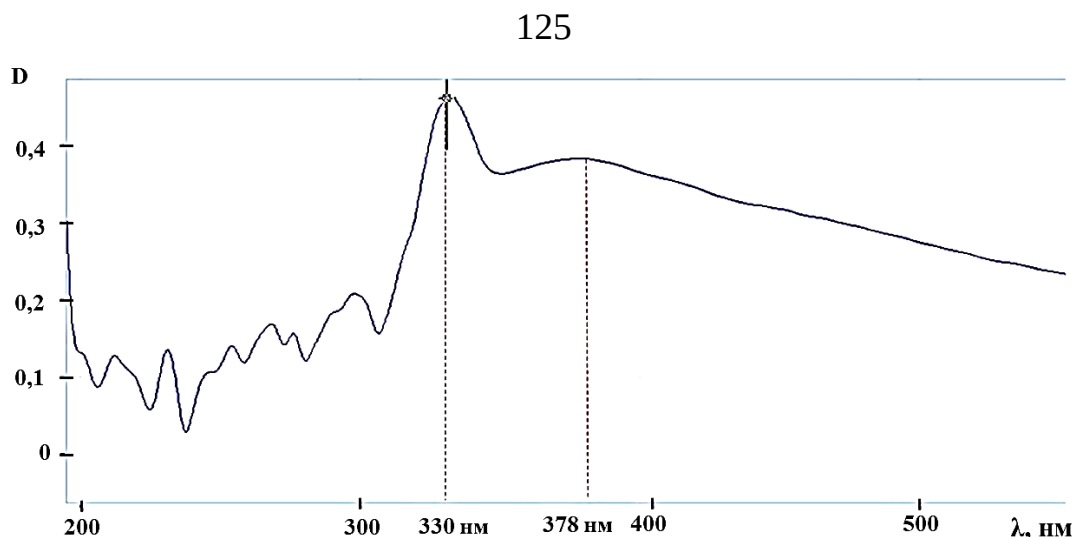


Рисунок 40 – Профиль электронного спектра извлечения образца многолетней коры дуба черешчатого

В обоих образцах фармакопейной и многолетней коры электронные спектры поглощения имеют выраженный пик (максимум) при $\lambda=330\pm3$ нм. Данная характеристика спектра соотносится с таковой для СО ситостерина и позволяет делать количественный пересчет на данное вещество [3, 4, 76, 96, 118].

Кроме того, в спектральные кривые поглощения обоих объектов детектируется максимум поглощения, отличающий объекты друг от друга. Так в извлечении из образца многолетней коры максимум детектируется в видимой части спектра при $\lambda=466\pm3$ нм. В извлечении из фармакопейной коры напротив, максимум находится в области УФ-света при $\lambda=378\pm3$ нм. Описанные максимумы характерны для комплексов ряда фенольных соединений, в частности, флавоноидов, содержащихся в данном объекте.

Определение стерина в анализируемых образцах проводили в пересчете на ситостерин при 330 нм, при этом использовался $E_{1\text{см}}^{1\%}$ равный 800; ниже приведена используемая нами формула для расчета содержания стерина в пересчете на СО ситостерина и абсолютно сухое сырье, выраженное в процентах (X) [3, 4, 76]:

$$X = \frac{Dx \cdot 25 \cdot 100 \cdot 100}{E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot m \cdot (100 - W)},$$

Где $E_{1\text{см}}^{1\%}$ - удельный показатель поглощения СО ситостерина равный 800;

D_x – значение оптической плотности.

Количественное содержание стеринов фармакопейном образце коры составило 3,17 %; в стволовой коре – 1,63 %.

Итак, проанализировав полученные нами результаты можно сделать вывод о том, что в фармакопейной коре дуба черешчатого присутствует высокое содержание стериновых соединений в отличие от коры многолетней, примерно в два раза. Полученные данные говорят о перспективности изученных образцов коры дуба черешчатого в качестве потенциального источника БАВ стериновой природы.

5.2.3. Научное обоснование рационального использования коры дуба черешчатого в фармацевтической практике

В рамках направления рациональной безотходного комплексного использования сырья растительных объектов, используемых в фармацевтической отрасли, целесообразным является изучение многолетней коры стволовых частей дуба черешчатого спектрофотометрическими, хроматографическими и титриметрическими методами. В рамках данного вопроса необходимым этапом работы было доказать перспективность применения многолетней коры дуба наряду с корой фармакопейной в качестве и обосновать методики ее стандартизации [8, 25, 26, 32, 37].

Ранее данный вопрос привлекал к себе внимание зарубежных ученых, результаты их исследований показали, что экстракты коры *Quercus robur* L.[113], рассматриваемые как отходы лесной промышленности, содержат высокое содержание биофенолов и обладают высокими антиоксидантными свойствами. Технология получения таких экстрактов достаточно проста, заключается в извлечении из сырьевых отходов (кора) БАВ, с отсутствием потребности в дополнительных стадиях обработки. Экстракты полученные таким способом, могут применяться как антимикробные средства, в качестве добавок в нутрицевтике, а также как косметические средства для предотвращения повреждений, вызванных окислительными процессами в организме человека, за

счет наличия антиоксидантных свойств экстрактивных веществ [113, 124, 128, 130, 133, 153, 167].

Объектами исследования являлись образцы коры дуба черешчатого *Quercus robur* L.: кора фармакопейная и многолетняя стволовая кора (рис. 41).



Рисунок 41 – Образцы дуба черешчатого коры многолетней и коры фармакопейной. Обозначения: *А* – кора фармакопейная; *Б* – кора многолетняя измельченная

Для определения зависимости размера частиц сырья и их влияния на эффективность извлечения БАВ был проведен анализ фракционного состава фармакопейной коры дуба и экспериментальной (многолетней) коры в соответствии с ОФС ГФ Российской Федерации. ОФС.1.1.0015.15 «Ситовой анализ» [20]. По результатам проведения фракционного анализа были отобраны образцы двух фракций Φ_2 и Φ_4 коры фармакопейной и коры многолетней. Размер сырья отбирался исходя из требований методики определения: для титриметрического метода анализа – 3 мм (Φ_2); для спектрофотометрического метода анализа 1 мм (Φ_4) (табл. 19) [20].

Таблица 19 – Анализ фракционного состава образцов коры дуба черешчатого

№ Фракции	Размер сита (мм)	Количество (в г) Фракции (фармакопейная кора)	Количество (в г) Фракции (многолетняя кора)
Φ_1	5	2,0	3,0
Φ_2	3	42,0	50,0
Φ_3	2	23,0	19,0
Φ_4	1	15,0	10,0

Φ_5	0,5	7,0	5,0
Φ_6	-	11,0	13,0
Σ		100,0	100,0

Объектами исследования являлись водно-спиртовые извлечения на концентрациях спирта этилового (50 %, 60 %, 70 % 80 %), а также на хлороформе в соотношении 1:5 (сырье-экстрагент) на основе фармакопейной коры и коры многолетней. Приготовление извлечений проводилось по методике ГФ РФ: «ОФС.1.5.3.0008.18» «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» [20].

Были проведены качественные реакции на флавоноиды (раствор алюминия хлорид), на дубильные вещества (железо-аммонийные квасцы) и простые фенолы (раствор диазореактива). В хлороформном извлечении флавоноиды и дубильные вещества не обнаружены, поэтому не изучались методом спектрофотометрии.

В качестве методов анализа извлечений использовалась хроматография в тонком слое сорбента, анализ проводили на пластинках марки «Sorbfil». ТСХ анализ проводили в системе «трихлорометан : этанол : вода» (25:18:2), применяемой для анализа флавоноидных гликозидов [20].

Детектирование пятен веществ проводили просматриванием хроматограмм в лампах при 254 нм и 366 нм. Кроме того, проводили обработку хроматограмм реагентом кислотой фосфорно-вольфрамовой 20 % (ФВК) при нагреве [20].

Спектрофотометрическое исследование проводили с суммарной оценки количества ДВ и флавоноидов в сырье на основе коры дуба черешчатого [14].

Анализ хроматограмм показал, что при проявлении реактивом фосфорно-вольфрамовой кислотой на пластинке можно увидеть разделение веществ с величиной R_f , сопоставимой с таковой у СО рутина и СО танина (рис. 42Б).

Хроматографическое исследование коры дуба черешчатого в сравнении со стандартом кверцетином позволило выявить его наличие в хлороформных и водно-спиртовых извлечениях в обоих образцах коры ($R_f \sim 0,82$). Наряду с кверцетином обнаружен также гликозид флавонола рутин ($R_f \sim 0,2$) Кроме того, ТСХ-анализ

позволил выявить в исследуемых образцах наличие танинов (рис. 42Б). Также в обоих образцах коры присутствует цинарозид ($R_f \sim 0,4$) (рис. 42Б).

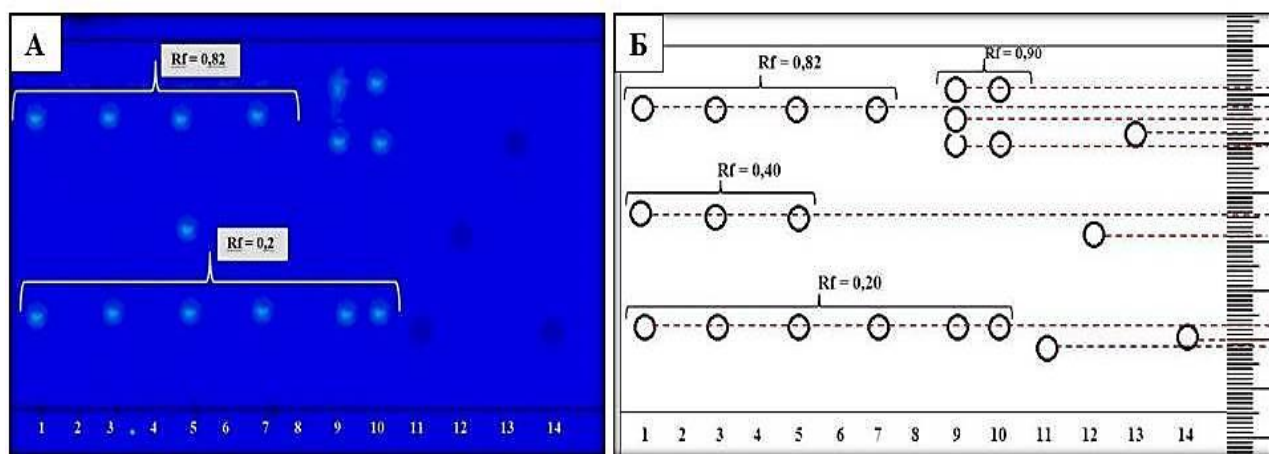


Рисунок 42 – Хроматограммы сравнения водно-спиртовых и хлороформных извлечений из образцов коры дуба черешчатого фармакопейной и многолетней. А – при облучении УФ – светом (366 нм). Б – после обработки реагентом фосфоно-вольфрамовой кислотой 20%. Обозначения: 1 – кора фармакопейная 50 % EtOH; 2 – кора многолетняя 50 % EtOH; 3 – кора фармакопейная 60 % EtOH; 4 – кора многолетняя 60 % EtOH; 5 – кора фармакопейная 70 % EtOH; 6 – кора многолетняя 70 % EtOH; 7 – кора фармакопейная 80 % EtOH; 8 – кора многолетняя 80 % EtOH; 9 – хлороформное извлечение коры фармакопейной; 10 – хлороформное извлечение коры многолетней; 11 – СО танина; 12 – СО цинарозида; 13 – СО кверцетина; 14 – СО рутина

Анализ хроматографических профилей в УФ-свете позволил обнаружить простые фенольные соединения по ярко-голубой люминесценции (рис. 42А).

Были проведены качественные реакции на флавоноиды (раствор алюминия хлорид), на дубильные вещества (железо-аммонийные квасцы) и простые фенолы (раствор диазореактива). В хлороформном извлечении флавоноиды и дубильные вещества не были обнаружены, поэтому не изучались методом спектрофотометрии.

Количественное определение суммы флавоноидов в образцах коры *Quercus robur* L.: коры фармакопейной и коры многолетней:

Методика: Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (т. н.) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 60 % этилового спирта. После этого колбу закрывают пробкой, взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,001$. Затем колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин. По истечении времени колбу охлаждают в течение 30-40 мин, снова взвешивают, предварительно закрыв той же пробкой и прибавляют испарившийся экстрагент до первоначальной массы. Полученное извлечение профильтровывают сквозь бумажный фильтр.

Описание процесса приготовления анализируемого раствора и раствора СО цинарозида (см. Глава 5; Раздел 5.2.2. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в почках дуба черешчатого).

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

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 5 \cdot 25 \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где: D – значение оптической плотности анализируемого раствора (образца); D_0 – значение оптической плотности анализируемого раствора СО цинарозида; m – масса сырья, г; m_0 – масса СО цинарозида, г; W – потеря в массе при высушивании в процентах.

Если отсутствует возможность использовать СО цинарозида, то можно исходить из его теоретического значения $E_{1\text{см}}^{1\%}$, который равен 334.

$$X = \frac{D \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{m \cdot 334 \cdot 5 \cdot (100 - W)},$$

где: D – значение оптической плотности анализируемого раствора (образца);
 m – навеска (масса образца) сырья, г; 334 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$)
 СО цинарозида при 400 нм; W – потеря в массе при высушивании в процентах.

Анализировались водно-спиртовые извлечения коры фармакопейной и коры многолетней на стандартных фармакопейных концентрациях (50 %; 60 %; 70 %; 80 %). Концентрации спирта этилового 40 % и 96 % не принимались во внимание так как, исходя из гистограммы сравнения, максимальный выход суммы флавоноидов наблюдался при экстракции 60 % водно-спиртовым извлечением (рис. 44). Выбор оптимального экстрагента 60 % спирта этилового подтверждается ранее проведенными исследованиями зарубежных ученых [128]. В ходе спектрофотометрического анализа были выявлены схожие профили спектральных кривых с значением в максимальной точке электронного спектра при 392 нм, что является характерным для флавона цинарозида (рис. 43). При расчетах анализа флавоноидов из последующего пересчета на СО цинарозид, выбрано значение длины волны при 400 нм, так как данное значение является максимальной точкой электронного (дифференциального) спектра, характерной для пиков спектральных кривых обоих образцов коры (рис. 43).

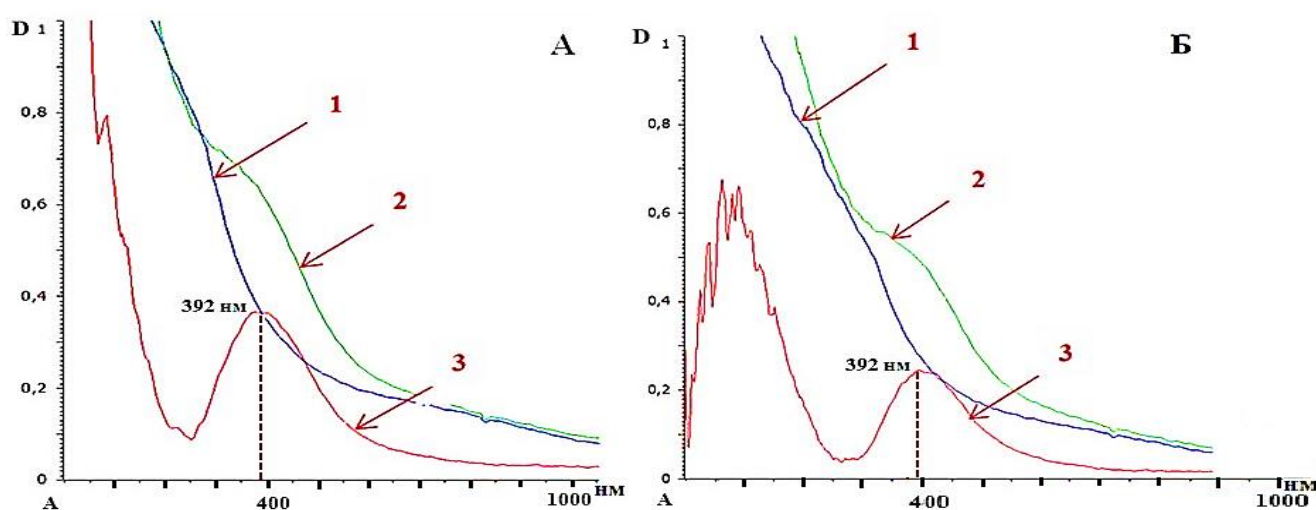


Рисунок 43 – Спектральные характеристики водно-спиртовых извлечений коры дуба на 60 % спирте этиловом (метод дифференциальной спектрофотометрии). А – Кора фармакопейная; Б – Кора многолетняя.

Обозначения: 1 – электронный спектр поглощения исходного раствора; 2 – электронный спектр поглощения раствора с раствором $AlCl_3$; 3 – дифференциальный электронный спектр

По результатам проведенного анализа было установлено, что 60 % водно-спиртовое извлечение из коры фармакопейной и многолетней отличаются относительно высоким количеством флавоноидов, при осуществлении пересчета на СО цинарозид (рис. 44). В частности, содержание флавоноидов в фармакопейной коре составляет $1,69 \% \pm 0,03$, в коре многолетней – $1,18 \% \pm 0,01$ (рис. 44).

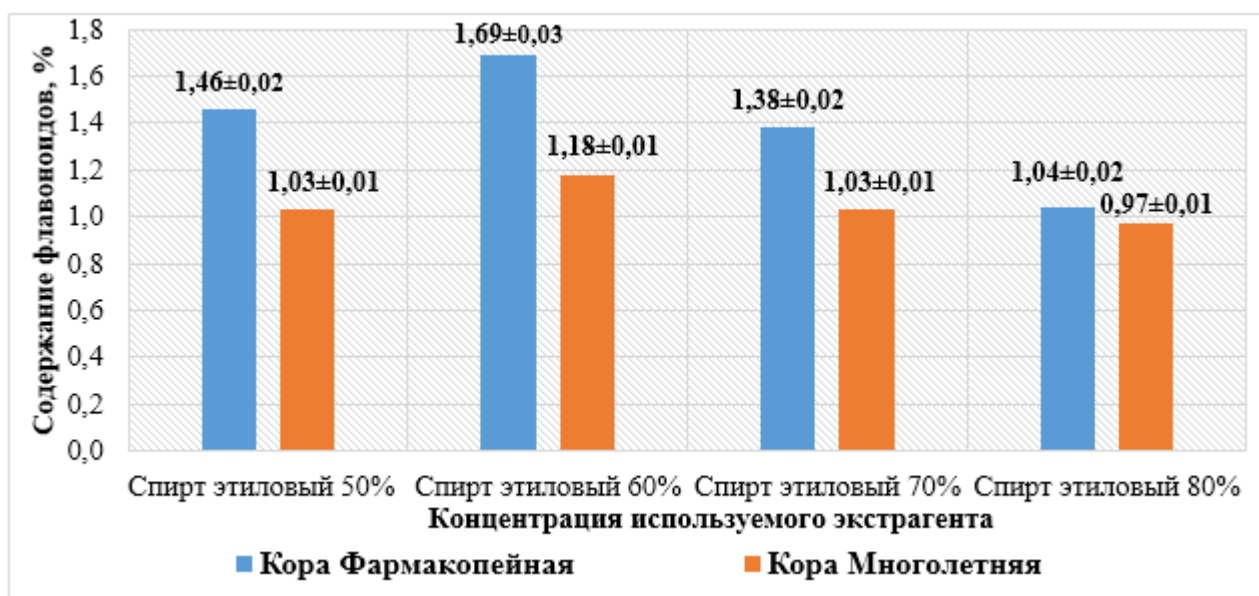


Рисунок 44 – Гистограмма сравнения содержания флавоноидов в образцах коры дуба черешчатого в зависимости от полярности экстрагента

Анализируя полученные данные, отмечается, что наиболее высокое содержания суммы флавоноидов как для фармакопейной коры, так и для коры многолетней, наблюдается при выборе в качестве экстрагента водного спирта 60 % (рис. 44).

Помимо количественного определения суммы флавоноидов в исследуемых образцах был проведен анализ количественного определения дубильных веществ двумя методами в соответствии с ГФ РФ ОФС.1.5.3.0008.18 [20].

При анализе ДВ спектрофотометрическим способом в пересчете на СО катехин учитывался рассчитанный в лабораторных условиях удельный показатель поглощения вещества катехина, равный 144 при 278 нм (рис. 45).

В результате количественного анализа дубильных веществ в фармакопейной коре составило $15,20 \% \pm 0,23$, в многолетней коре – $8,88 \% \pm 0,10$ (рис. 45).

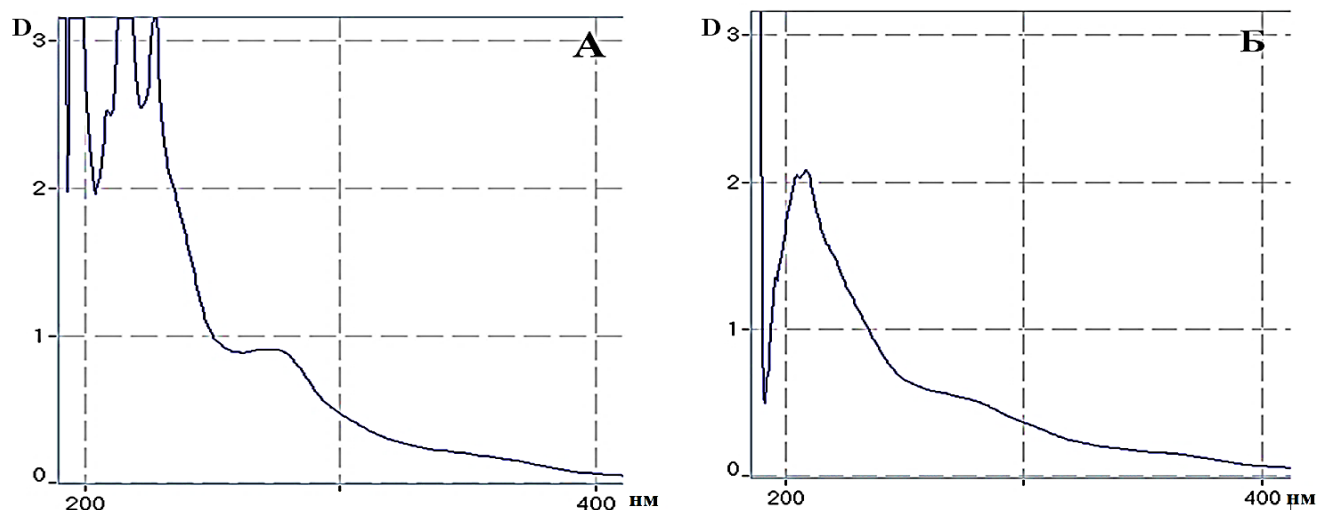


Рисунок 45 – Спектральные характеристики водно-спиртовых извлечений.

Обозначения: *A* – кора фармакопейная; *B* – кора многолетняя

Определение содержания дубильных веществ титриметрическим методом проводилось по фармакопейной методике в соответствии с ОФС.1.5.3.0008.18 (метод 1) [20].

В результате титриметрического анализа и статистической обработки данных были получены следующие результаты: в коре фармакопейной содержание дубильных веществ составило $8,19 \% \pm 0,14$, в многолетней коре – $2,14 \% \pm 0,06$ (рис. 46; табл. 20). Многолетняя кора отличается заниженными числовыми значениями содержания дубильных веществ в отличие от коры фармакопейной (рис. 46).

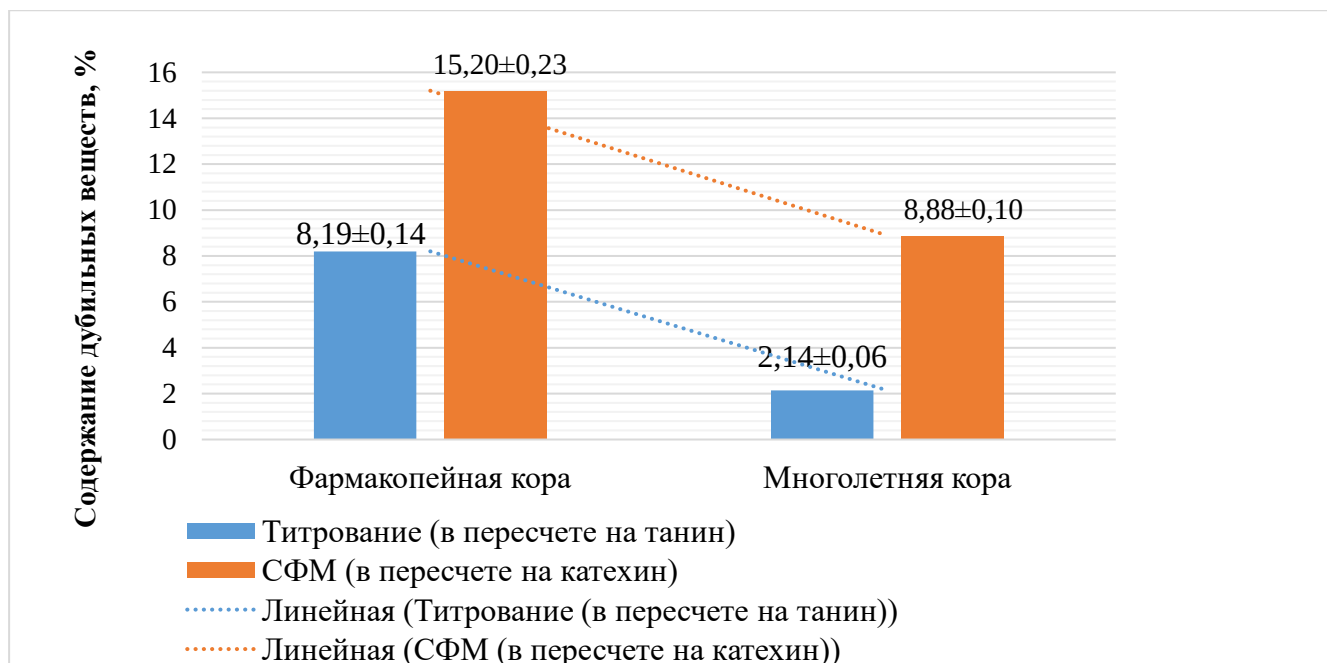


Рисунок 46 – Гистограмма сравнения количественного содержания дубильных веществ в образцах коры дуба черешчатого

Метод перманганатометрии в сравнении с методом спектрофотометрии дает значительно меньшие показатели количественного содержания веществ, вероятно, это связано с окислением в сырье помимо дубильных веществ, имеющейся суммы БАВ (рис. 46).

Таблица 20 – Метрологическая оценка методики результатов эксперимента

Определение суммы флавоноидов (в пересчете на цинарозид)								
№ п/п	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Показатели метрологической оценки	f	$\bar{X}$	S^2	S	$P, \%$	$t(P, f)$	$\pm x$	$\varepsilon, \%$
Фармакопейная кора	10	1,690909	0,011429	0,106907	95	1,34587	0,032234	1,9
Многолетняя кора	10	1,184545	0,002947	0,054289	95	1,40860	0,016369	1,38
Определение ДВ методом спектрофотометрии (пересчет на катехин)								
№ п/п	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.

Показатели метрологической оценки	f	$\bar{X}$	S^2	S	$P, \%$	$t(P, f)$	$\pm x$	$\varepsilon, \%$
Фармакопейная кора	10	15,20364	0,591225	0,768912	95	2,01084	0,231836	1,52
Многолетняя кора	10	8,88855	0,121391	0,348413	95	2,03093	0,105050	1,18
Определение дубильных веществ методом титриметрии (пересчет на танин)								
№ п/п	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
Показатели метрологической оценки	f	$\bar{X}$	S^2	S	$P, \%$	$t(P, f)$	$\pm x$	$\varepsilon, \%$
Фармакопейная кора	10	8,196364	0,243285	0,493240	95	2,05001	0,148717	1,81
Многолетняя кора	10	2,144091	0,047455	0,217841	95	2,21063	0,065682	3,0

Таким образом, было проведено сравнительное спектрофотометрическое, титриметрическое и хроматографическое исследование коры дуба черешчатого на основе фармакопейного сырья и сырья многолетней коры дуба. В ходе сравнения водно-спиртовых извлечений в концентрациях 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, а также хлороформных извлечений образцов коры дуба, выявлено, что наибольшее содержание дубильных веществ и флавоноидов в многолетней коре наблюдается при использовании в качестве экстрагента водного спирта 60 %.

В рамках решения актуальных проблем природопользования, показана целесообразность использования не фармакопейного сырья – многолетней коры дуба.

5.3. Количественное определение БАВ в настойке листьев дуба черешчатого

В целях стандартизации препаратов на основе листьев дуба черешчатого является важным разработка методов количественной оценки БАВ современными инструментальными методами.

Исследовалась настойка листьев дуба черешчатого, полученная методом дробной перколяции в соотношении 1:5 в объеме 1500 мл, масса используемого сырья – 300,0 г. При проведении исследования использовался метод дифференциальной УФ-спектрофотометрии, в качестве стандартных образцов использовались рутин и астрагалин.

В процессе проведения спектрофотометрического исследования настойки листьев дуба черешчатого (экстрагент - 70 % этанол) в дифференциальном варианте наблюдался максимум поглощения при длине волны 406 нм, характерный для флавоноидов. Это значение близко к длине волны максимума поглощения в дифференциальном спектре СО рутина (412 нм) (рис. 47 и 48) [8]. Нами предложены два варианта количественного определения флавоноидов в листьях дуба: в пересчет на рутин и астрагалин.

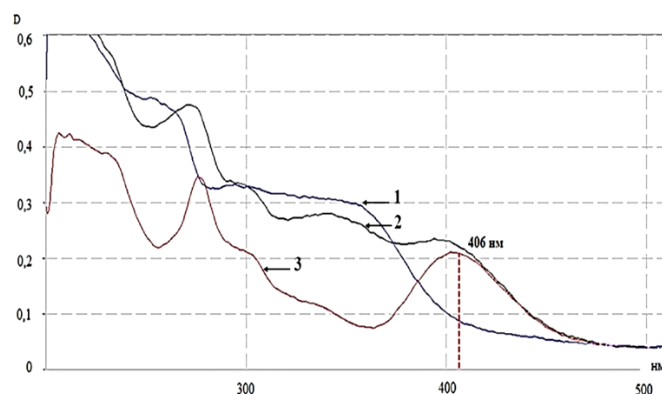
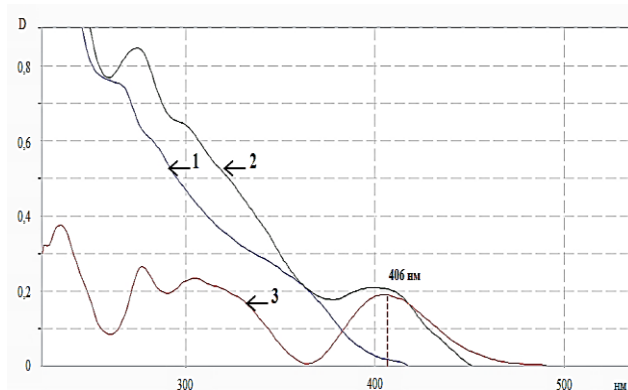


Рисунок 47– Электронные спектры образца настойки листьев дуба черешчатого. Обозначения: 1 - кривая спектра поглощения раствора; 2 – электронный спектр раствора + $AlCl_3$ (3 %; EtOH); 3 – электронный (дифф.) кривая спектр образца	Рисунок 48 – Электронные спектры поглощения водно-спиртового раствора астрагалина. Обозначения: 1 – электронный спектр астрагалина (прямая спектрофотометрия); 2 – электронный спектр астрагалина + $p-p AlCl_3$ (3 %; EtOH); 3 – электронный (дифф.) спектр астрагалина
---	--

Для количественной оценки флавоноидов (в пересчете на рутин и астрагалин) в настойке листьев *Quercus robur* L. использовалась методика, разработанная нами ранее для анализа листьев дуба черешчатого (см. пункт 5.2.1.; Глава 5), с небольшими изменениями в формуле расчета содержания флавоноидов в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X), которая представлена ниже:

$$X = \frac{D \cdot V_{к1} \cdot V_{к1}}{E_{1\%} \cdot V_{п1} \cdot V_{п1}} = \frac{D \cdot 25 \cdot 25 \cdot 25}{240 \cdot 2 \cdot 5 \cdot 5},$$

где D – значение оптической плотности раствора;

$V_{к1}$ и $V_{к2}$ – Объемы используемых колб в пробоподготовке;

$V_{п1}$ и $V_{п2}$ – Объемы лабораторных пипеток, используемых при пробоподготовке;

$E_{1\%}$ – удельный показатель поглощения; для СО рутина – 240 (412 нм), для астрагалина – 300 (при 406 нм);

q – объем образца настойки (аликвота).

В результате количественной оценки суммы флавоноидов в настойке листьев дуба черешчатого получены следующие значения: в пересчете на СО рутин – $0,24 \pm 0,003$ %, в пересчете на астрагалин – $0,33 \pm 0,003$ %.

Методом ТСХ обнаружены сходства хроматографических профилей настойки листьев *Quercus robur* L. и водно-спиртового раствора астрагалина (рис. 49).

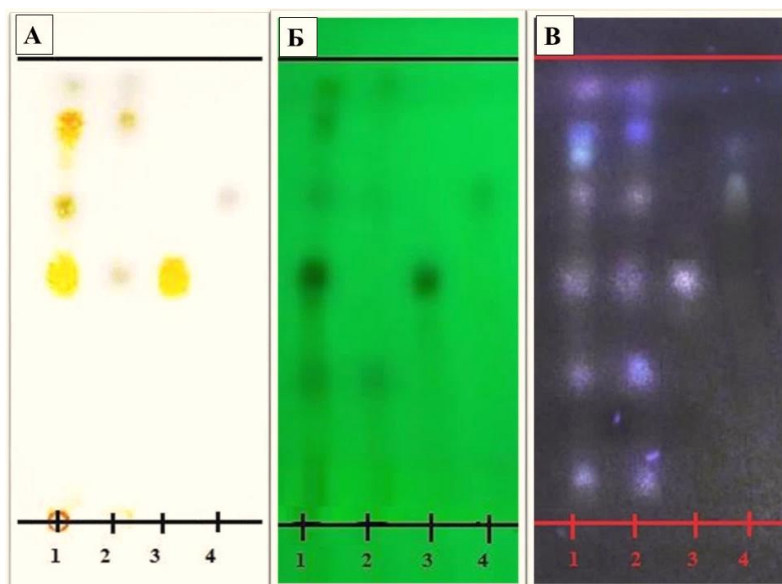


Рисунок 49 – Хроматографические профили исследуемых образцов.

А – детектирование при дневном свете; Б – детектирование в УФ-свете с $\lambda = 254$ нм; В – детектирование в УФ-свете с $\lambda=366$ нм. Обозначения:

1 – настойка листьев дуба черешчатого; 2 – водно-спиртовое извлечение листьев дуба черешчатого; 3 – астрагалин; 4 – кверцетин.

Также была проведена метрологическая оценка данных, по результатам которой ошибка единичного определения суммы флавоноидов в настойке листьев *Quercus robur* L. с доверительной вероятностью 95 % составляет: при пересчете на СО рутин – $0,24 \pm 0,003$ %, (I), при пересчете на астрагалин – $0,33 \pm 0,003$ %. (II) (табл. 21).

Таблица 21 – Метрологическая оценка результатов количественного определения суммы флавоноидов в настойке листьев дуба черешчатого

№ п/п	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.
I.								
Показатели метрологической оценки	f	$\bar{X}$	S^2	S	$P, \%$	$t(P, f)$	$\pm x$	$\varepsilon, \%$
Пересчет на СО рутин	8	0,236667	0,000125	0,011180	95	2,4378	0,003727	1,57
II.								
№ п/п	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.

Показатели метрологической оценки	f	$\bar{X}$	S^2	S	$P, \%$	$t(P, f)$	$\pm x$	$\varepsilon, \%$
Пересчет на астрагалин	8	0,33444	0,000103	0,010138	95	1,9715	0,003379	1,01

5.4. Изучение процесса биоаккумуляции (динамики накопления) флавоноидов в листьях *Quercus robur* L.

Исследовались листья *Quercus robur* L., которые нами были заготовлены в Самарском Ботаническом саду в период «май – сентябрь» за два последующих года «2020 - 2021 гг.». Образцы листьев дуба черешчатого отбирались с трех разных деревьев одного вида с разного уровня кроны, в начале и конце месяца. Сырье, отобранное для анализа, подвергалось сушке в естественных условиях без солнечного света. Применялся спектрофотометрический метод количественного анализа флавоноидов в образцах листьев *Quercus robur* L., из расчета на два БАВ: на рутин и на астрагалин по методикам, разработанным и описанным нами ранее для данного вида сырья [84].

Ранее авторами Куприяновой Е.А., Куркиным В.А. проводилось аналогичное исследование касательно изучения процесса биоаккумуляции (динамики накопления) флавоноидов [46]. Также ранее автором В.В. Стеняевой проводилось исследование по определению процесса биоаккумуляции БАВ в листьях березы бородавчатой [92].

В результате были изучены электронные профили спектров извлечений листьев *Quercus robur* L. и определено количественное содержание флавоноидов. Отмечалось, что профили дифференциальных спектров исследуемых образцов, соответствуют профилям дифференциальных спектров СО рутина и РСО астрагалина. Исходя из этого, пересчет веществ на сумму флавоноидов в исследуемых образцах сырья проводился на два вещества.

Определено, что наибольшее содержание суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого отмечается для образцов, собранных в период с конца мая по начало июня в пересчете на астрагалин (2,54 %) и в пересчете на СО рутина (2,06 %). Таким образом, рекомендуется заготавливать листья дуба черешчатого в период с конца мая по начало июня, поскольку в данное время наблюдается наибольшее

содержание суммы флавоноидов, а также диагностически значимых веществ в листьях дуба черешчатого. Результаты спектрофотометрического определения количественного содержания БАВ в листьях *Quercus robur* L. представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Данные изучения процесса биоаккумуляции флавоноидов в листьях *Quercus robur* L., исходя из времени сбора 2020 и 2021 гг.

№ п/п	Дата сбора сырья	Среднее значение результатов эксперимента	Ошибка среднего результата
Пересчет на астрагалин			
1.	10.05.2020-21	2,24	0,003
2.	25.05.2020-21	2,54	0,006
3.	10.06.2020-21	2,27	0,006
4.	25.06.2020-21	1,81	0,023
5.	10.07.2020-21	2,11	0,042
6.	25.07.2020-21	1,64	0,005
7.	10.08.2020-21	2,08	0,013
8.	25.08.2020-21	1,36	0,009
9.	10.09.2020-21	2,40	0,006
10.	25.09.2020-21	1,29	0,021
Пересчет на СО рутин			
1.	10.05.2020-21	1,80	0,007
2.	25.05.2020-21	2,06	0,010
3.	10.06.2020-21	1,88	0,014
4.	25.06.2020-21	1,51	0,004
5.	10.07.2020-21	1,73	0,004
6.	25.07.2020-21	1,37	0,005
7.	10.08.2020-21	1,72	0,008
8.	25.08.2020-21	1,13	0,004
9.	10.09.2020-21	2,08	0,054
10.	25.09.2020-21	1,02	0,019

На сравнительной диаграмме видно, что наибольшее количество флавоноидов из расчета на рутин (2,06 %) и из расчета на астрагалин (2,54 %) за

2020 и 2021 года, лежит в временном промежутке времени «конец мая – начало июня» (рис. 50). Из полученных нами результатов, отображенных на диаграмме сравнения видно, что точки с максимальным содержанием флавоноидов в ходе вегетационного периода в листьях дуба черешчатого выглядят схожим образом для обсуждаемых ранее растительных объектов [46, 92], что, вероятно, связано с особенностями протекания химических процессов флавоноидов в растительных объектах (рис. 50).

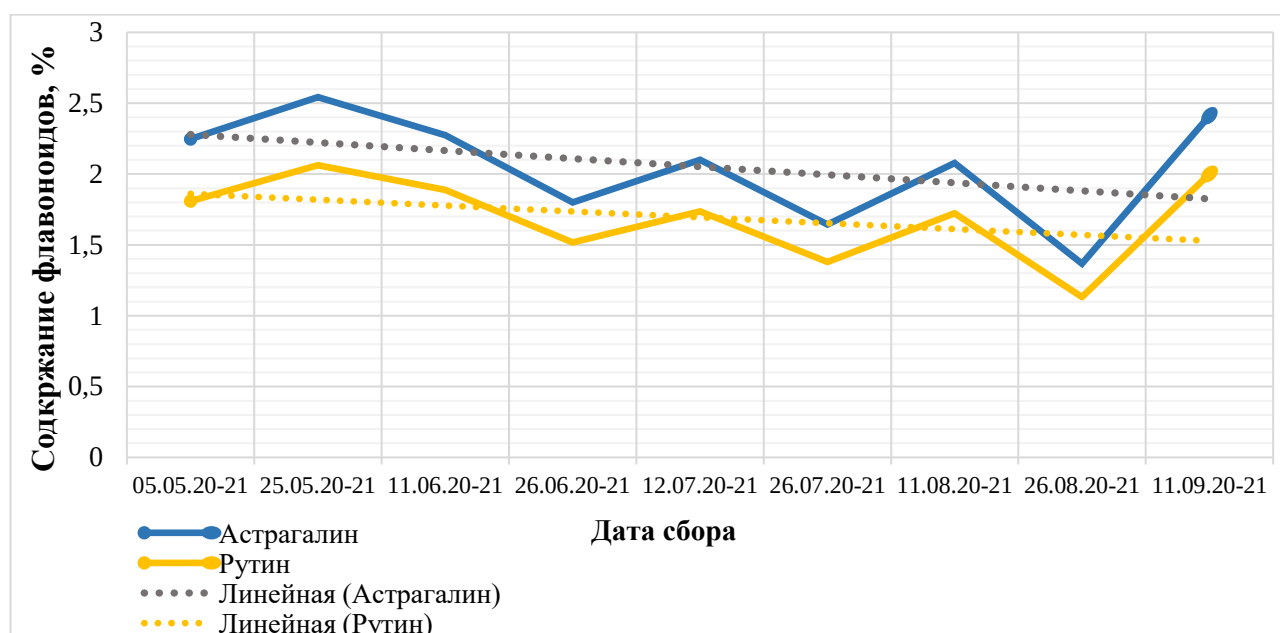


Рисунок 50 – Сравнительная диаграмма исследования процесса биоаккумуляции БАВ флавоноидов в листьях *Quercus robur* L.

Таким образом, целесообразно использовать временной промежуток времени (конец мая – начало июня) для сбора листьев *Quercus robur* L., поскольку в это время вегетационного периода наблюдается наибольшее содержание БАВ – флавоноидов. Определено, что в большей степени флавоноиды в листьях дуба черешчатого аккумулируются в период с конца мая по начало июня.

5.5. Определение нормируемых ГФ РФ числовых показателей перспективного вида ЛРС «Дуба черешчатого листа»

В целях разработки нормативной документации для включения нового вида ЛРС листьев дуба черешчатого в ГФ РФ необходимым является определение числовых нормируемых значений данного вида сырья [20, 39, 40, 52, 86, 87, 94]. Исследование проводилось по требованиям ГФ РФ, ОФС «Листья» ГФ РФ XIV издания для цельного и измельченного сырья [20].

Результаты изучения числовых нормируемых значений для измельченного и целого сырья представлены в таблице 23.

Таблица 23 – Результаты изучения числовых нормируемых значений сырья «Дуба черешчатого листа»

Испытания	Показатели для цельного сырья	Показатели для измельченного сырья
Количественное определение		
Влажность	Не более 9 %	Не более 8 %
Зола общая	Не более 10 %	Не более 10 %
Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте	Не более 3 %	Не более 3 %
Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин	Не менее 0,30%	Не менее 0,63%
Содержание суммы дубильных веществ	Не более 2 %	Не более 2 %
Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 70% спиртом	Не менее 35 %	Не менее 35 %
Измельченность и содержание примесей		
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм	Не более 5%	-
Частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм	-	Не более 5 %

Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм	-	Не более 5 %
Посторонние примеси		
Допустимые примеси	Части сырья, утратившие окраску, присущую данному виду	Части сырья, утратившие окраску, присущую данному виду
Органические примеси	Не более 2%	Не более 1%
Минеральные примеси	Не более 2%	Не более 1%

Таким образом, для листьев дуба черешчатого нами были разработаны и рекомендованы к использованию числовые нормируемые значения в рамках создания проекта ФС на новый вид ЛРС «Дуба черешчатого листа».

В качестве показателя срока годности для листьев дуба черешчатого предлагается использовать период не более 2-х лет с момента сбора сырья.

5.6. Определение числовых показателей для перспективного вида ЛРС «Дуба черешчатого почки»

В данном разделе приводятся результаты изучения нормируемых значений, предъявляемых ГФ РФ для сырья «Дуба черешчатого почки». Исследование осуществлялось в соответствии с ОФС «Почки» ГФ РФ XIV издания для цельного и измельченного сырья [18, 20].

Значения полученных в ходе исследования числовых нормируемых значений сырья представлены в таблице 24.

Таблица 24 – Результаты изучения числовых нормируемых значений сырья «Дуба черешчатого почки»

Испытания	Показатели для цельного сырья	Показатели для измельченного сырья
Количественное определение		
Влажность	Не более 9 %	Не более 8 %
Зола общая	Не более 10 %	Не более 10 %

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте	Не более 2 %	Не более 2 %
Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин	Не менее 0,25%	Не менее 0,25%
Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 70% спиртом	Не менее 21 %	Не менее 21 %
Измельченность и содержание примесей		
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм	Не более 5 %	-
Частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм	-	Не более 8 %
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм	-	Не более 4 %
Посторонние примеси		
Допустимые примеси	Части сырья, утратившие окраску, присущую данному виду	Части сырья, утратившие окраску, присущую данному виду
Органические примеси	Не более 1 %	Не более 1 %
Минеральные примеси	Не более 1 %	Не более 1 %

Таким образом, для почек дуба черешчатого нами были разработаны и рекомендованы к использованию числовые нормируемые значения в рамках создания проекта фармакопейной статьи «Дуба черешчатого почки».

В качестве показателя срока годности для почек дуба черешчатого предлагается использовать период не более 2-х лет с момента сбора сырья.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Предложены способы качественного анализа водно-спиртовых извлечений дуба черешчатого и его близкородственных видов методом дифференциальным спектрофотометрическим методом (при 406 нм) и методом ТСХ в системе растворителей «трихлорметан : этанол : вода» (25:18:2) с подтверждением наличия веществ рутина и астрагалина с определением их хроматографических характеристик: для астрагалина $R_f = 0,66$, для рутина $R_f = 0,54$.
2. Для целей количественного анализа флавоноидов в листьях *Quercus robur* L. предложена методика дифференциального спектрофотометрического анализа (длина волны 412 нм; СО – флавоноид рутин). Исходя из количественной оценки флавоноидов в листьях *Quercus robur* L., определено, что содержание данной группы БАВ в сырье варьирует от 0,30 % до 1,63 % (нижний предел – не менее 0,30 %).
3. Для целей количественного анализа флавоноидов в почках *Quercus robur* L. приводится методика дифференциального спектрофотометрического анализа (длина волны – 400 нм; СО – флавоноид цинарозид). Исходя из количественной оценки флавоноидов в почках *Quercus robur* L., определено, что содержание данной группы БАВ в сырье варьирует от 0,27 % до 0,44 % (нижний предел – не менее 0,25 %).
4. Для коры дуба черешчатого адаптирована методика количественного определения стерина. Содержания стерина в фармакопейном образце коры составило 3,17 %; в многолетней коре – 1,63 %.
5. В ходе сравнительного анализа водно-спиртовых извлечений образцов коры дуба черешчатого что наибольшее содержание дубильных веществ и флавоноидов в многолетней коре наблюдается при использовании в качестве экстрагента водного спирта 60 % (содержание флавоноидов в фармакопейной коре составляет $1,69 \% \pm 0,03$, в коре многолетней – $1,18 \% \pm$

0,01; дубильных веществ в фармакопейной коре 15,20 % $\pm$ 0,23, в многолетней коре – 8,88 % $\pm$ 0,10).

6. Разработаны условия качественного анализа настойки листьев дуба черешчатого методом ТСХ, ВЭЖХ-анализа. По итогам количественного анализа настойки листьев дуба черешчатого методом дифференциальной УФ-спектроскопии получены следующие значения: в пересчете на рутин – $0,24 \pm 0,003$ %, в пересчете на диагностически значимый компонент астрагалин – $0,33 \pm 0,003$ %. Методом ВЭЖХ в настойке листьев дуба черешчатого идентифицировано 7 веществ.
7. Проанализирован процесс накопления суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого. Выявлено, что наибольшее содержание суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого отмечается для образцов, собранных в период с конца мая по начало июня в (пересчет на астрагалин – 2,54 %; на рутин – 2,06 %).
8. Изучены числовые показатели в рамках создания проекта ФС на новый вид ЛРС «Дуба черешчатого листа».
9. Изучены числовые показатели качества в рамках создания проекта ФС на новый вид ЛРС «Дуба черешчатого почки».

ГЛАВА 6. ОБОСНОВАНИЕ ПЕРСПЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ДУБА ЧЕРЕШЧАТОГО *QUERCUS ROBUR L.* В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ

Использование лекарственных препаратов на основе ЛРС на сегодняшний день остается актуальной задачей фармацевтической и медицинской практики [47, 127, 137, 148, 157, 160, 161, 164, 167, 169].

Скрининговый анализ в микробиологических методах исследования достаточно широко используется многими учеными в фармацевтической и медицинской практике [148].

Также, на наш взгляд, актуальным является изучение диуретической активности БАВ листьев дуба черешчатого – астрагалина.

Не менее важным является необходимость проведения экспериментальной работы по выявлению острой токсичности экстракционного препарата настойки листьев дуба черешчатого для обоснования безопасности медицинского его использования [14].

6.1. Сравнительное определение антимикробной активности водно-спиртовых извлечений коры дуба черешчатого

Изучение фармакологической активности многолетней коры дуба черешчатого тесно связано с вопросом рационального природопользования и вторичной переработки сырья. Помимо применения «классического» фармакопейного сырья – молодых побеговых частей дуба интерес представляет многолетняя кора стволовых частей дерева [8, 20]. Кора дуба черешчатого многолетняя, собранная со стволовых частей дерева – является отходами деревоперерабатывающей промышленности и не применяется в фармацевтической практике, в то время может применяться в качестве альтернативного сырья коре фармакопейной для получения ценных БАВ, таких как флавоноиды, дубильные вещества и др. [8].

Нами исследовались образцы коры дуба черешчатого *Quercus robur* L.: кора фармакопейная (Образец № 1) и многолетняя стволовая кора дуба черешчатого – кора многолетняя (Образец № 2), полученная в качестве отходов производства от деревоперерабатывающей компании.

В процессе проведения исследования в качестве объектов использовались водно-спиртовые извлечения коры на концентрациях спирта этилового 40 %, 60 %, 70 %, 96 %, а также на хлороформе в соотношении «сырье-экстрагент» 1:50. Отдельно изучена антимикробная активность используемых концентраций спирта этилового в целях объективной оценки вклада антимикробного действия извлекаемой суммы БАВ помимо антимикробного действия этанола. В качестве стандарта была протестирована настойка эвкалипта на 70 % этаноле (Рис. 51; табл. 26).

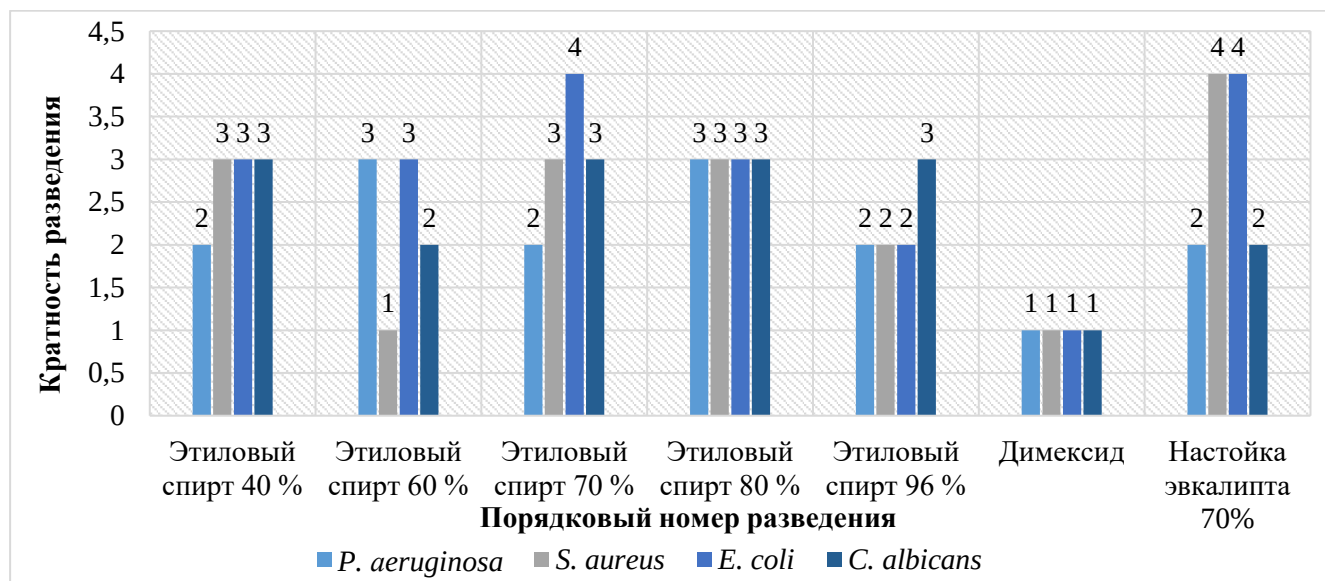


Рисунок 51 – Минимальные подавляющие концентрации стандартных образцов («отрицательный» контроль)

В качестве тестовых культур были использованы штаммы Американской коллекции типовых культур: *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, а также *C. albicans*.

В результате тестирования 40 % водно-спиртового извлечения фармакопейной коры дуба черешчатого (образец № 1) были получены следующие результаты: задержка роста наблюдалась для штаммов микроорганизмов *S. aureus*

и *E. coli* при разведении 4 раза; для штаммов *P. aeruginosa* – при разведении в 8 раз; для штаммов *C. albicans* – при разведении в 16 раз (табл. 25; рис. 52).

В процессе тестирования водно-спиртового извлечения фармакопейной коры дуба черешчатого (образец № 1) на 60 % спирте этиловом были получены следующие результаты: наблюдается задержка роста для штаммов микроорганизмов *S. aureus* и *E. coli* при разведении в 16 раз; для штаммов *P. aeruginosa* и *C. albicans* – при разведении в 32 раза (табл. 25; рис. 52).

В ходе тестирования 70 % водно-спиртового извлечения фармакопейной коры дуба черешчатого (образец № 1) наблюдалась задержка роста для штаммов микроорганизмов *S. aureus* и *E. coli* при разведении в 8 раз; для штаммов *P. aeruginosa* – при разведении в 32 раза; для штаммов *C. albicans* – при разведении в 16 раз (табл. 25; рис. 52).

Тестирования 96 % водно-спиртового извлечения фармакопейной коры дуба черешчатого (образец № 1) были получены следующие результаты: наблюдалась задержка роста для штаммов микроорганизмов *S. aureus* и *E. coli* при разведении в 16 раз; для штаммов *P. aeruginosa* и *C. albicans* – при разведении в 32 раза (табл. 25; рис. 52).

В результате тестирования 40 % водно-спиртового извлечения многолетней коры дуба (Образец № 2) наблюдалась схожая картина задержки роста для всех штаммов с результатами анализа фармакопейной коры (образца № 1) в аналогичных условиях, что говорит о схожем спектре БАВ. При анализе были получены следующие результаты: наблюдалась задержка роста для штаммов микроорганизмов *S. aureus* и *E. coli* в разведениях в 4 раза; в отношении штаммов *P. aeruginosa* и *C. albicans* – в разведениях в 16 раз (табл. 25; рис. 52).

В процессе тестирования водно-спиртового извлечения многолетней коры дуба черешчатого (Образец № 2) на 60 % спирте этиловом были получены следующие результаты: наблюдается задержка роста для штаммов микроорганизмов *S. aureus* и *E. coli* (разведение в 16 раз); для штаммов *P. aeruginosa* и *C. albicans* (разведение в 32 раза (табл. 25; рис. 52).

В процессе исследования 70 % водно-спиртового извлечения многолетней коры дуба черешчатого (Образец № 2) наблюдалась задержка роста следующих штаммов: для *P. aeruginosa* – разведение в 32 раза, для *E. coli* при разведении в и *C. albicans* при 16-ти кратном разведении; для *P. aeruginosa* и *C. albicans* задержка роста до 32-х кратного разведении (табл. 25; рис. 52).

Антимикробная активность также была обнаружена для водно-спиртового извлечения многолетней коры дуба черешчатого (Образец №2) на 96 % спирте этиловом. В результате задержка роста при разведении в 32 раза наблюдалась для микроорганизмов *S. aureus* – при разведении в 16 раз, для *E. coli* и *C. albicans* при разведении в 32 раза; в отношении *P. aeruginosa* наблюдалась задержка роста при разведении до 64-х раз (табл. 25; рис. 52).

В результате тестирования хлороформного экстракта фармакопейной коры дуба черешчатого (Образец № 1) было обнаружено антимикробное действие в отношении всех указанных штаммов. В частности, при 16-кратном разведении наблюдается антимикробная активность в отношении штамма *P. aeruginosa*; при 8-кратном разведении в отношении штаммов *S. aureus* и *E. coli*; при разведении в 32 раза – против *C. albicans* (табл. 25; рис. 52).

При тестировании хлороформного экстракта многолетней коры дуба черешчатого (Образец № 2), выявлено антимикробное действие в отношении всех указанных штаммов аналогичное результатам тестирования фармакопейной коры. В частности, при 16-кратном разведении наблюдается антимикробная активность в отношении штамма *P. aeruginosa*; при 16-кратном разведении в отношении штаммов *S. aureus* и *E. coli*; разведение в 32 раза – в отношении *C. albicans* (табл. 25; рис. 52).

При анализе изучаемых экстрактов можно сделать вывод об эффективности экстрактов многолетней коры дуба черешчатого как хлороформных, так и спиртовых. На диаграмме сравнения антимикробной активности исследуемых образцов видно, что наибольшим антимикробным эффектом обладают водно-спиртовые извлечение фармакопейной и многолетней коры дуба черешчатого (Образец № 1 и Образец № 2) в концентрации спирта этилового 60 %, 70 % и 96 %

в отношении штаммов *P. aeruginosa* и *C. albicans* при кратности разведения 1:32 (рис. 52). В наименьшей степени антимикробную активность проявляют водно-спиртовые извлечения обоих образцов коры в отношении штаммов микроорганизмов *E. coli* и *S. aureus* (табл. 25; рис. 52).

Все извлечения обоих образцов коры дуба черешчатого имеют стабильный антимикробный эффект по отношению к штамму *C. albicans* и *P. aeruginosa* (рис. 52). При разведении в 128 раз наблюдался рост всех микроорганизмов (табл. 25).

Диаграмма сравнения результатов эксперимента представлена на рисунке 52.

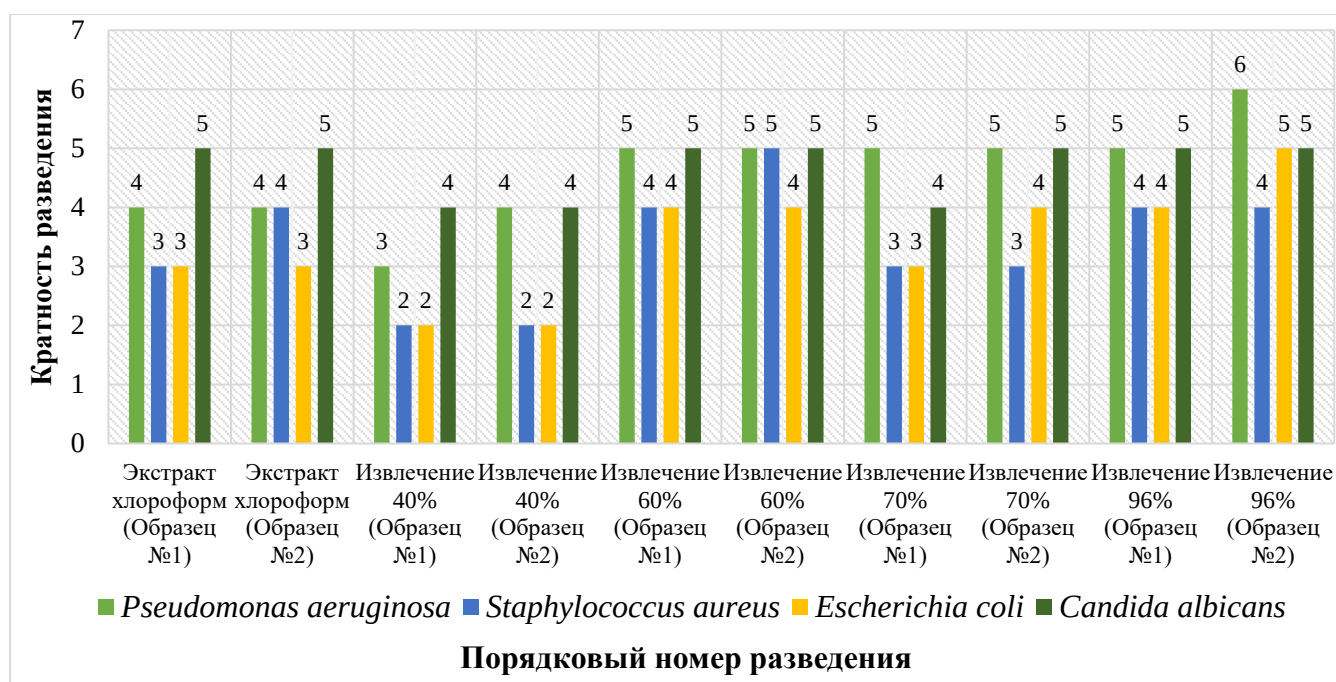


Рисунок 52 – Сравнительная диаграмма антибактериальной активности извлечений коры дуба черешчатого: фармакопейная (образец № 1), многолетняя (образец № 2)

По результатам выполненной работы можно сделать вывод, что водно-спиртовые и хлороформные извлечения образцов коры фармакопейной (образец № 1) и коры многолетней (образец № 2) обладают выраженной антимикробной активностью в отношении всего перечня используемых видов штаммов. Рационально в качестве оптимального экстрагента для исследуемых образцов коры использовать 60 % спирт этиловый (не смотря на наибольший антимикробный

эффект при использовании 96 % спирта), поскольку при использовании данной концентрации спирта этилового соблюдается баланс между содержанием дубильных веществ и флавоноидов в извлечении, а также при данной концентрации спирта этилового наблюдается максимальный антимикробный эффект.

В рамках стратегии безотходного производства данное исследование будет способствовать решению вопроса вторичной переработки древесных отходов дуба черешчатого и рационального использования его в фармацевтической практике.

6.2. Сравнительное определение антимикробной активности водно-спиртовых извлечений листьев и почек дуба черешчатого

Изучение антимикробных свойств листьев и почек дуба черешчатого позволит расширить спектр фармакологической активности *Q. robur* и оценить возможности использования данного объекта при создании препаратов, применяемых при антибактериальной терапии.

В ходе проведения скрининга антимикробной активности извлечений листьев и почек дуба черешчатого были получены следующие результаты:

При тестировании 40 % водно-спиртового извлечения листьев дуба черешчатого наблюдалась антимикробная активность в отношении штамма *P. aeruginosa* при четырехкратном разведении, а также в отношении микроорганизмов *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* при восьмикратном разведении (табл. 27). При сравнении 40 % водно-спиртового извлечения с «отрицательным» стандартом (минимальной подавляющей концентрацией для 40% водного-спирта) отличий антимикробной активности между исследуемым образцом и образцом сравнения не наблюдалось (табл. 27). Что говорит об отсутствии вклада имеющегося в экстракте комплекса БАВ в фармакологический эффект при данной концентрации извлечения [163].

Для 70 % водно-спиртового извлечения листьев дуба черешчатого антимикробная активность была выраженной в отношении *P. aeruginosa* в восьмикратном разведении; в отношении *S. aureus* при разведении в 32 раза; для

штамма *C. albicans* – при восьмикратном разведении. Подавление роста штамма *E. coli* наблюдалось при двукратном разведении (табл. 27; табл. 26; рис. 51; рис. 53).

Антимикробная активность 80 % водно-спиртового извлечения листьев дуба черешчатого была выраженной в отношении *E. coli* при разведении в 64 раза; в отношении *S. aureus*, *C. albicans* и *P. aeruginosa* при разведении в 16 раз (табл. 27). Для водно-спиртового извлечения листьев на 80% спирте этиловом наблюдается максимальная задержка роста микроорганизмов. При сравнении с «отрицательным» стандартом спирта этилового в концентрации 80 % наблюдается значительное подавление роста микроорганизмов (табл. 27; табл. 26; рис. 51; рис. 53).

Антимикробная активность 96 % водно-спиртового извлечения листьев дуба черешчатого была выраженной в отношении всех штаммов при восьмикратном разведении; в отношении *S. aureus*, *C. albicans* и *E. coli* при 16-ти кратном разведении; в отношении *E. coli* наблюдалась наибольшая активность при 32 разовом разведении (табл. 27). Показатели «отрицательного» контроля для 96% концентрации спирта этилового были значительно меньше по сравнению с исследуемым образцом (табл. 27; табл. 26; рис. 51; рис. 53) [163].

Анализ 40 % водно-спиртового извлечения почек дуба черешчатого дает меньший антимикробный эффект в сравнении с 40 % водно-спиртовым извлечением листьев дуба черешчатого (табл. 27; табл. 26). В частности, извлечение почек в данной концентрации спирта этилового является выраженной в отношении штаммов *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* при восьмикратном разведении; наряду с прочими штаммами при 32 кратном разведении наблюдалась более выраженная активность в отношении штамма *C. albicans* (табл. 27; табл. 26; рис. 51; рис. 53).

В ходе тестирования 70 % водно-спиртового извлечения почек дуба черешчатого отмечалась снижение микробиологической активности микроорганизмов *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* при восьмикратном разведении. В отношении штаммов *P. aeruginosa* антимикробная активность наблюдалась при 16 кратном разведении. Максимально выраженный

антимикробный эффект был зафиксирован в отношении штамма *C. albicans* при 32 кратном разведении (табл. 27; табл. 26; рис. 53; рис. 51).

Антимикробная активность 80 % водно-спиртового извлечения почек дуба черешчатого отмечалась в отношении штамма *E. coli* при разведении в 32 раза, а также в отношении штамма *S. aureus*, *C. albicans* и *P. aeruginosa* при разведении в 16, 16 и 32 раз соответственно (табл. 27). При сравнении с «отрицательным» стандартом спирта этилового в концентрации 80% наблюдается значительное подавление роста микроорганизмов (табл. 26; табл. 27; рис. 51; рис. 53).

Исследование антимикробной активности 96 % водно-спиртового извлечения почек дуба черешчатого дало следующие результаты: антимикробная активность в отношении всего перечня используемых штаммов при 16 кратном разведении; в отношении *P. aeruginosa* и *C. albicans* также наблюдалась активность при 32 кратном разведении (рис. 53; табл. 27).

Определены условия получения лекарственной формы настойки: в качестве экстрагента для изготовления настойки листьев дуба черешчатого и настойки почек дуба черешчатого был выбран 70 % спирт этиловый, поскольку данная концентрация является оптимальными экстрагентом для сырья, содержащего комплекс биологически активных веществ группы флавоноидов, обеспечивающих антимикробный эффект препарата [163]. В качестве альтернативной концентрации предлагается также использовать 80 % этанол, поскольку использование данной концентрации позволяет обеспечивать выраженный антимикробный эффект наряду 70 % концентрацией этанола.

Антимикробный эффект экстракционного препарата настойки листьев дуба черешчатого на 70 % наблюдался в отношении всех указанных штаммов. В частности, при 16-ти кратном разведении наблюдается антимикробная активность в отношении штамма *P. aeruginosa* и штамма *S. aureus*; при разведении в 32 раза – в отношении *E. coli* и при разведении в 64 раза – в отношении *C. albicans* (рис. 53; табл. 27) [163].

В ходе тестирования препарата настойки почек дуба черешчатого на 70 % спирте этиловом получены следующие результаты: антимикробный эффект

наблюдался штамм *P. aeruginosa* при разведении в 64 раза; при шестнадцатикратном разведении наблюдается антимикробная активность в отношении штамма *S. aureus*; в 32-х кратном разведении – в отношении *E. coli* и *C. albicans* (рис. 53; табл. 27) [163].

Таким образом, проведен скрининг антимикробной активности водно-спиртовых извлечений листьев и почек дуба черешчатого, в результате которого доказана антимикробная активность в отношении всех выбранных штаммов микроорганизмов. Наиболее эффективными объектами с максимальной задержкой роста микроорганизмов являются извлечение листьев и почек дуба черешчатого на 70 % и 80 % этаноле в соотношении «сырье – экстрагент» (1:50) и препараты настойка листьев и почек дуба черешчатого на 70% экстрагенте в соотношении «сырье – экстрагент» (1:5) (рис. 53; табл. 27). Для полученных извлечений почек дуба черешчатого наблюдается стабильный антимикробный эффект на все исследуемые штаммы микроорганизмов. Максимальный антимикробный эффект для настойки листьев дуба отмечается в отношении штаммов *E. coli* и *C. albicans*. Максимальный антимикробный эффект для настойки почек дуба отмечается в отношении штаммов *E. coli*, *P.aeruginosa* и *C. albicans* (рис. 53; табл. 27).

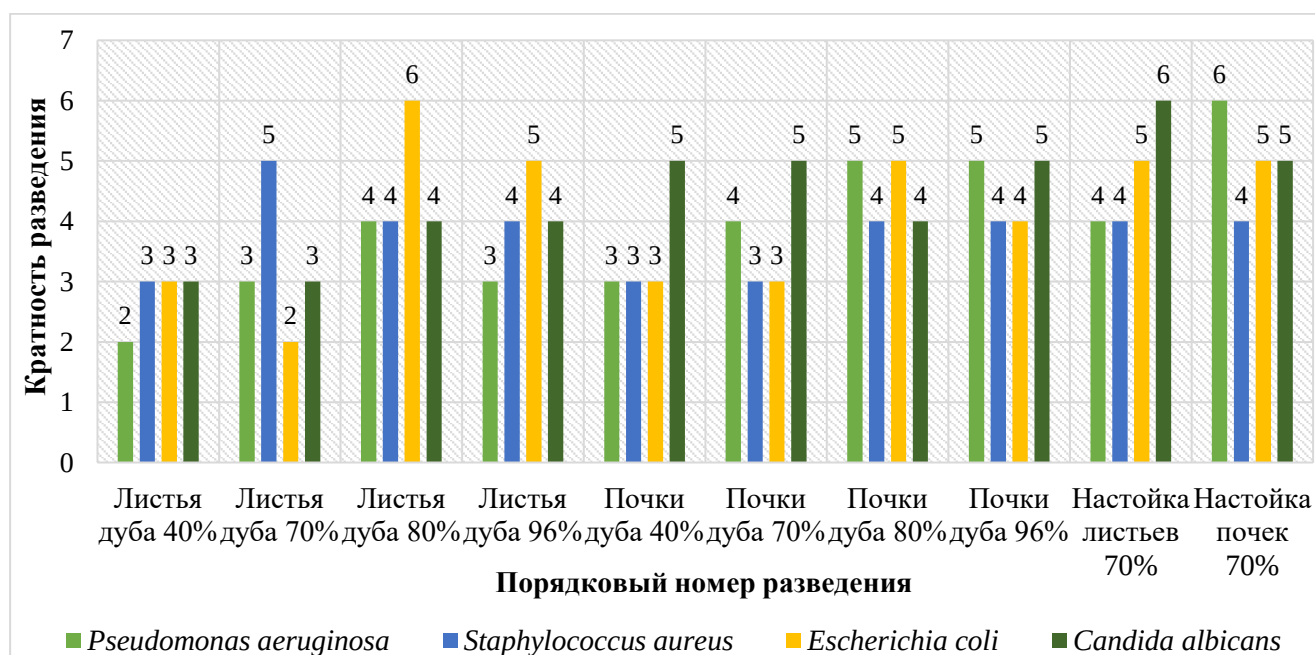


Рисунок 53 – Сравнительная диаграмма антибактериальной активности спиртовых извлечений листьев и почек *Q. robur* L.

По итогам выполненной работы было установлено, что все изучаемые объекты дают стабильный антимикробный эффект в отношении штаммов *S. aureus* и *C. albicans*.

Экстракционные препараты настойка листьев и почек дуба черешчатого, полученные на спирте этиловом 70 %, исходя из соотношения «сырье – экстрагент» (1:5) являются наиболее эффективными объектами и дают максимальную задержку роста микроорганизмов при разведении в 32 и 64 раза.

Узконаправленное действие с максимальным антимикробным эффектом на *C. albicans* оказывает препарат настойка листьев дуба черешчатого в соотношении «сырье – экстрагент» (1:5); на штаммы *S. aureus* – 70 % водно-спиртовое извлечение в соотношении в соотношении «сырье – экстрагент» (1:50) (рис. 53). Водно-спиртовые извлечения почек дуба оказывают сходный стабильный максимальный антимикробный эффект в отношении *C. albicans*; для штаммов *P. aeruginosa*, *S. aureus* и *E. coli* отмечается максимальный антимикробный эффект при концентрации экстрагента – 96 % спирта этилового. Минимальная антимикробная активность отмечается для 70 % водно-спиртового извлечения из листьев дуба черешчатого в соотношении «сырье – экстрагент» (1:50) на штаммы *E. coli*, а также для 40 % водно-спиртового извлечения почек дуба черешчатого в соотношении «сырье – экстрагент» (1:50) на штаммы *P. aeruginosa* (рис. 53).

Выбор 70 % концентрации спирта этилового как экстрагента для получения настойки сделан исходя из того, что лекарственные формы в данной концентрации спирта обладают лучшей проникающей способностью в глубокие слои эпидермиса по сравнению с более высокими концентрациями спирта [23]. Также, при данных параметрах экстракции отмечается наибольший антимикробный эффект в отношении изучаемых штаммов микроорганизмов (рис. 53).

Все полученные в ходе исследования результаты могут служить основанием для создания новых антибактериальных средств с использованием экстрактов листьев и почек дуба черешчатого, а также для внедрения препаратов настойки листьев и почек дуба черешчатого на 70 % спирте этиловом в медицинскую и фармацевтическую практику.

6.3. Изучение диуретической активности диагностически значимого вещества листьев дуба черешчатого – астрагалина

В результате проведенного исследования обнаружено креатининуретическое действие БАВ астрагалина – диагностически значимого компонента листьев дуба черешчатого. Выявлено, что в хроническом эксперименте, который длился в течении 4 часов, при однократном внутрижелудочном введении астрагалина в дозе 0,005 г/кг на фоне 3 % водной нагрузки у лабораторных крыс опытной группы по отношению к показателям водного контроля отмечалось значительное достоверное повышение креатининуреза (на 78 %), что косвенно свидетельствует о повышении клубочковой фильтрации (табл. 28; табл. 29). Креатинин является продуктом белкового обмена в организме [34, 98]. Уменьшение экскреции креатинина с мочой приводит к росту уровня креатинина в крови, а это, в свою очередь, свидетельствует о снижении уровня клубочковой фильтрации, и, как правило, о наличии патологии почек [142, 143].

Достоверных изменений экспериментально исследуемых показателей выделительной функции почек в процессе проведения суточного хронического эксперимента (однократное внутрижелудочное введение вещества астрагалина; доза 0,005 г/кг на фоне 3 % водной нагрузки) у животных опытной группы относительно показателей водного контроля не отмечалось.

Таблица 28 – Влияние внутрижелудочного введения растительных лекарственных препаратов и БАВ на экскреторную функцию почек интактных крыс ($M \pm m$, $n = 10$)

Время, ч	Показатели	Контроль Вода	Опыт БАВ дуба астрагалин, 5 мг/кг
4	Диурез, мл	2,02±0,08	1,81±0,11
	Достоверность О/К	-	p=0,164
	Экскреция креатинина, мг	0,09±0,01	0,16±0,02 **
	О/К	-	p=0,007
24	Диурез, мл	2,12±0,25	1,95±0,15

	Достоверность О/К	-	p=0,340
	Экскреция креатинина, мг	2,80±0,19	2,60±0,14
	О/К	-	p=0,407

Примечание: здесь и далее

* - $p < 0,05$ - достоверность отличий данных опытной группы и контрольной группы,

** - $p < 0,01$ - достоверность отличий данных опытной группы и контрольной группы,

*** - $p < 0,001$ - достоверность отличий данных опытной группы и контрольной группы.

Таблица 29 – Влияние внутрижелудочного введения растительных лекарственных препаратов и БАВ на экскреторную функцию почек интактных крыс (Med [Min; Max], n = 10)

Время, ч	Показатели	Контроль Вода	Опыт БАВ дуба астрагалин, 5 мг/кг
4	Диурез, мл	2,07 [1,63; 2,25]	1,80 [1,47; 2,42]
	Достоверность О/К	-	p=0,164
	Экскреция креатинина, мг	0,09 [0,06; 0,12]	0,16 [0,08; 0,27] **
	Достоверность О/К	-	p=0,007
24	Диурез, мл	2,58 [2,28; 3,70]	2,48 [2,14; 3,17]
	Достоверность О/К	-	p=0,340
	Экскреция креатинина, мг	2,24 [1,29; 3,02]	1,98 [1,43; 2,37]
	Достоверность О/К	-	p=0,407

Таким образом, проведено исследование мочегонной активности диагностически значимого вещества листьев дуба черешчатого астрагалина, в ходе эксперимента выявлено креатининуретическое действие астрагалина. Повышение уровня креатинина в крови свидетельствует в большинстве случаев о развитии различной патологии почек, в связи с этим поиск новых фармакологических средств, обладающих креатининуретическим действием, имеет большое значение для клинической практики.

6.4. Изучение острой токсичности спиртовой настойки листьев дуба черешчатого

Определение острой токсичности лекарственных препаратов является необходимым критерием оценки их безопасности. Поэтому нами было проведено исследование оценки острой токсичности для препарата настойки листьев дуба

черешчатого. С этой целью использовались две группы лабораторных белых беспородных крыс. В каждую из групп отбирались 10 животных [20, 63]. Группа I получала однократно внутрижелудочно исследуемый препарат в дозе 15 г/кг на фоне 3% водной нагрузки в соответствии с государственными требованиями к безопасности. Группа II использовалась в качестве контроля, животные этой группы получали воду очищенную в таком же объеме, что и группа I. Далее оценивалось состояние животных на протяжении всего дня. Эксперимент выполнялся в течении двух недель. Фиксировались случаи летального исхода (таковых не было) и изменения, связанные с поведением. В соответствии с государственными требованиями к безопасности, и, с учетом полученных результатов, делали заключение о наличии/отсутствии острой токсичности (класс токсичности: IV) [19].

На протяжении всего проведенного эксперимента не фиксировалось у животных летальных случаев. Также не наблюдались изменения в поведении крыс. Таким образом, препарат «Дуба черешчатого листьев настойка» в соответствии с государственными требованиями к безопасности [19] (малоопасные вещества; класс токсичности – IV).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6

1. Проведена предварительная оценка антимикробной активности в условиях *in vitro* извлечений и препаратов на основе коры, листьев и почек дуба черешчатого. Обнаружено, что
 - выраженную антимикробную активность отмечается для экстракционного препарата (настойка) листьев *Quercus robur* L., которая наблюдается при использовании 70 % и 80 % спирта этилового;
 - для извлечений коры *Quercus robur* L. отмечается максимальное замедление роста микроорганизмов при концентрации спирта 60% и 96 %;
 - для извлечений почек *Quercus robur* L. отмечается максимальный антимикробный эффект при использовании более низких концентраций спирта – 40 % и 70 % в отношении штаммов *P. aeruginosa*, *E. coli* и *C. albicans*.
2. Предлагается использование в качестве противомикробных лекарственных средств следующие препараты: «Дуба черешчатого листьев настойка на 70% спирте этиловом», «Дуба черешчатого почек настойка на 70 % спирте этиловом» и «Дуба черешчатого кора настойка на 60 % спирте этиловом», поскольку данные концентрации экстрагента обеспечивают полноценный выход веществ в препарат, а также обеспечивают наибольший антимикробный эффект.
3. Хлороформные извлечения коры *Quercus robur* L. обладают умеренной антимикробной активностью, что говорит о возможности дальнейшего использования данного экстрагента, обеспечивающего максимальное извлечение липофильных веществ из коры *Quercus robur* L.
4. Изучена диуретическая активность вещества астрагалина, для которого обнаружено креатининуретическое действие;
5. Исследование настойки листьев дуба черешчатого на 70 % этиловом спирте на предмет наличия острой токсичности, показало возможность безопасного ее применения в медицинской практике. По итогам работы исследуемый препарат был отнесен к малоопасным веществам (IV класс).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

1. Выявлены диагностические признаки перспективного сырья *Quercus robur* L.:
 - для листьев дуба черешчатого характерно: опушение эпидермиса и жилки нижней сторон листа простыми одноклеточными волосками и железистыми трихомами с розово-красной (при $\lambda=420$ нм) и оранжево-желтой (при $\lambda=360$ нм) люминесценцией. В жилках содержатся кристаллические включения в виде друз и монокристаллов; Вещества флавоноидной природы (астрагалин, кверцитрин и рутин) в основном локализованы в зоне проводящей системы листа (ксилема). Дубильные вещества - в структуре механической ткани (склеренхима) и эпидермиса).
 - выявлены особенности петиолярной анатомии близкородственных видов рода *Quercus*, которые отличаются между собой по очертаниям поперечных срезов в базальной, медиальной и апикальной частях, а также по характеру опушения;
 - Определены диагностические признаки почек дуба: особенности расположения крупных фрагментов соцветий и примордиев, характер кроющих чешуй, особенности опушения и структуры проводящей системы.
2. Впервые из листьев дуба черешчатого методом адсорбционной колоночной хроматографии выделены и идентифицированы вещества 3-О- α -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- β -D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-3',-метоксифлавонон.
3. Предложено для определения подлинности листьев дуба черешчатого использовать метод тонкослойной хроматографии, с использованием системы «трихлорметан : этиловый спирт : вода» (25:18:2), в присутствии стандартного образца рутина ($R_f = 0,54$) и диагностически значимого компонента астрагалина.

Также предлагается использовать метод УФ-спектроскопии (в электронном спектре поглощения водно-спиртового извлечения в дифференциальном варианте имеет два максимума: при длине волны 320 ± 2 нм и 406 ± 2 нм) с использованием СО рутина. Кроме того, разработаны методики анализа препарата «Дуба черешчатого листьев настойка» методами ТСХ, ВЭЖХ- и УФ-спектрофотометрии. В процессе качественного анализа подтверждено наличие в настойке листьев дуба черешчатого 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 в качестве стандартного образца рутина (длина волны 412 нм; содержание суммы флавоноидов в пределах от 0,30 % до 1,63 %).
Разработана и научно обоснована методика количественного определения суммы флавоноидов в почках *Quercus robur* L. спектрофотометрическим методом с использованием стандартного образца цинарозида (длина волны 400 нм; содержание флавоноидов находится в пределах от 0,27 % до 0,44 %).
5. Изучена антимикробная активность в условиях *in vitro* водно-спиртовых извлечений и препаратов на основе коры, листьев и почек дуба черешчатого в отношении штаммов микроорганизмы: *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*. 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; Выполнено исследование острой токсичности «Дуба черешчатого листьев настойка (экстрагент - 70 % этанол)», результаты которого подтверждают безопасность ее использования в медицинской практике.
7. Регламентированы показатели качества для ЛРС *Quercus robur* L.: 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 лекарственного растительного сырья – «Дуба черешчатого листа».

Практические рекомендации. Результаты, полученные в рамках исследований данной диссертационной работы, предлагается использовать при совершенствовании подходов к стандартизации ЛРС *Quercus robur* L., разработке лекарственных препаратов на его основе, в учебном и научном процессе дисциплин «Фармацевтическая химия» и «Фармакогнозия», а также в фармацевтических организациях, осуществляющих свою работы в области создания, стандартизации и контроля качества лекарственных растительных препаратов.

Перспективы и направления дальнейших исследований. Выполнение научно-исследовательской работы в рамках данного диссертационного исследования имеет важную научно-практическую значимость для дисциплин «фармацевтическая химия» и «фармакогнозия» в плане последующего изучения химического состава растительных объектов, содержащих флавоноиды и дубильные вещества, и разработки методик стандартизации лекарственного растительного сырья, которые отвечают современным требованиям Государственной Фармакопеи Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абаимов, В.Ф. Дендрология: учебное пособие для студентов высших учебных заведений, обучающихся по специальности "Лесное хозяйство". - 3-е изд., перераб. – Москва. Академия, 2009. – С. 185-191.
2. Абдуллина, С.Г. Кулонометрическое определение дубильных веществ в лекарственном растительном сырье / С.Г. Абдуллина, Н.М. Агапова, Г.К. Зиятдинова, Р.Ш. Хазиев, С.А. Сидуллина, Г.К. Будников. // Фармация. 2010. – № 4. – С. 13-15.
3. Балагозян, Э.А. Исследование стериновых соединений густого экстракта корневищ с корнями крапивы двудомной / В.М. Рыжов // Сборник материалов IV Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация - потенциал будущего», – Санкт-Петербург: Изд-во СПХФА. – 2014. – С. 406-408.
4. Балагозян, Э.А. Фармакогностическое исследование корневищ с корнями крапивы двудомной (*Urtica dioica* L.), – 2017. – С. 158-161.
5. Барыкина, Р.П. и др. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. – М.: Изд-во МГУ, 2004. – 312 с.
6. Бездубная, Е.В. Сравнительная морфологическая характеристика листьев дуба обыкновенного (*Quercus robur* L.) и дуба скального (*Quercus petraea* Liebl.) / Е.В. Бездубная // Беликовские чтения. Материалы VII Всероссийской научно-практической конференции. – 2019. – С. 302-311.
7. Белов Павел Викторович. «Фармакогностическое исследование каштана конского обыкновенного (*Aesculus hippocastanum* L.) как перспективного источника биологически активных веществ» : Специальность 14.04.02 "Фармацевтическая химия, фармакогнозия" : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Белов Павел Викторович. – Самара, 2020. – 164 с.
8. Бельчинская, Л.И. Использование отходов деревообрабатывающей промышленности (коры дуба и древесных опилок) в качестве адсорбентов

формальдегида / Л.И. Бельчинская, О.В. Лавлинская, А.Д. Колешня // Технологии и оборудование деревообработки в XXI веке сборник научных трудов. Министерство образования Российской Федерации, Воронежская государственная лесотехническая академия. – Воронеж, 2001. – С. 120-125.

9. Бубенчикова, В. Н. Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве чабреца / В. Н. Бубенчикова, Ю. А. Старчак // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2012. – № 22-1(141). – С. 157-160.

10. Буданцев, А.Л. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Том. 1. Семейства *Actinidiaceae-Malvaceae, Euphorbiaceae-Haloragaceae*. Санкт-Петербург, Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2009. – 158 с.

11. Булыгин, Н.Е. Дендрология. 2-е изд., перераб. и доп. Ил. – (Учебники и учеб. пособия для высш. учеб. заведений) – Л.: Агропромиздат, 1991. – 352 с.

12. Валягина-Малютина, Е.Т. Деревья и кустарники Средней полосы Европейской части России: Определитель, – СПб.: «Специальная Литература», 1998. – С. 150-151.

13. Васильев, В.П. Аналитическая химия. Книга 2: Физико-химические метода анализа: учеб. для студ. вузов, обучающихся по химико-технол. спец.- 5-е изд., стереотип. / В.П. Васильев. – М.: Дрофа, 2005. – 383 с.

14. Высочина, Г. И. Фенольные соединения *Filipendula ulmaria* (Rosaceae) и близкородственных таксонов с различной экологической приуроченностью / Г. И. Высочина, В. А. Костикова, Е. С. Васфилова // Растительный мир Азиатской России: Вестник Центрального сибирского ботанического сада СО РАН. – 2016. – № 4(24). – С. 63-71.

15. Гаммерман, А.Ф. Дикорастущие лекарственные растения СССР /А.Ф. Гаммерман, И.И. Гром. - М.: изд-во "Медицина". – 1976. – С. 55-56.

16. Генкина, Г.Л. Спектрофотометрия гликозидов олеаноловой кислоты и хедерагенина в концентрированной серной кислоте / Л.Г. Мжельская // Химия природных соединений. – 1977. – № 2. – С. 220-227.

17. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук. – Новосибирск: Наука, Сиб. отд., 1990. – С. 236-238.
18. Горовой, П.Г. Таксономическое значение анатомического строения черешков листьев в роде *Megadenia* Maxim. (*Cruciferae*) / П.Г. Горовой, Е.В. Болтенков, О.В. Яковлева, Р.В. Дудкин // Доклады академии наук, 2011. – Вып. 439. ч.1. – С. 129-131.
19. ГОСТ 12.1.007-76. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности.
20. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. XIV изд. Т. I-IV. М., 2018. [Электронный ресурс] URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (дата обращения: 16.04.2021).
21. Государственная фармакопея СССР. 11-е издание / МЗ СССР. – Вып. 1: Общие методы анализа. – М.: Медицина, 1987. – 336 с.
22. Государственная фармакопея СССР. 11-е издание/ МЗ СССР. – Вып. 2: Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.
23. Государственный реестр лекарственных средств РФ [Электронный ресурс] – URL: <https://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx> (Дата обращения 31.03.2019 г.).
24. Гринкевич, Н.И. Лекарственные растения: справочное пособие / Н.И. Гринкевич, И.А. Баландин, В.А. Ермакова, Е.Б. Зорин, Е.Я. Ладыгина, И.А. Самылина, И.Н. Сокольский. – М.: Высшая школа, 1992. – 398 с.
25. Гринько, Е.Н. Обоснование выбора метода количественного определения дубильных веществ в лекарственном растительном сырье / Е.Н. Гринько // Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI Веке». – 2010. – № 2. – С. 172-173.
26. Гринько, Е.Н. Требования Российской и Европейской фармакопей к методикам определения содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье / Е.Н. Гринько // Фармация. – 2010. – № 5. – С. 49-53.

27. Губанов, И.А. Иллюстрированный определитель растений Средней России. Т.-2: Покрытосеменные (двудольные: раздельнолепестные) / И.А. Губанов, К.В. Киселёва, В.С. Новиков, В.Н. Тихомиров // М.: Т-во научных изданий КМК, Ин-т технологических исследований, 2003. – 34 с.
28. Гужва, Н. Н. Содержание и состав полифенолов, кумаринов астрагала серпоплодного, произрастающего в Пятигорском флористическом районе / Н. Н. Гужва // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2012. – Т. 141. – No. 22-2 – С. 27-34.
29. Дейл, З. Жидкостная колоночная хроматография (пер. с англ.) / З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака // Под ред. докт. Хим. Наук, профессора В.Г. Березкина. – М.: Мир. – 1978. – 544 с.
30. Доклад об экологической ситуации в Самарской области за 2020 год. Выпуск 31. - Самара, 2021. – 165 с.
31. Долгова, А.А. Руководство к практическим занятиям по фармакогнозии / А.А. Долгова, Ладыгина Е.Я. – М.: Медицина, 1977. – 275 с.
32. Евдокимова, О.В. Разработка показателей подлинности коры дуба / О. В. Евдокимова // Электронный научно-образовательный вестник «Здоровье и образование в XXI веке». Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова. – 2012. – Т. 14, – № 7. – С. 112-113.
33. Жезняковская, Л.Ф. Стоматологические пленки на основе растительных экстрактов / Л.Ф. Жезняковская, Д.Г. Долинина, Л.Б. Оконенко // Фармация № 7, 2012. – С. 35-37.
34. Зайцева, Е. Н. Экспериментальное обоснование нового подхода к фармакотерапии почечной недостаточности в сочетании с гравитационным воздействием: специальность 14.03.06 "Фармакология, клиническая фармакология": диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Зайцева Елена Николаевна. – Самара, 2017. – 308 с.
35. Иванова А.В., Мазуренко М.Т. Варианты реализации онтогенетической траектории *Quercus robur* (Fagaceae) Самарской области // Ботанический журнал. - 2013. - Т. 98, № 8. - С. 1014-1030.

36. Исамбеков, Ш.Ю. Дубильные вещества природного происхождения / Ш.Ю. Исамбеков, А.К. Каримджанов // Химия природ. соедин. – 1990. – № 3. – С. 293–304.
37. Калинин, А. М. Стандартизация лекарственного растительного сырья и растительных препаратов, содержащих дубильные вещества / А. М. Калинин, Т. Н. Боковикова, Н. П. Антонова // Фармация. – 2016. – Т. 65. – № 8. – С. 14-17.
38. Кароматов, И.Д. Дуб обыкновенный - применение в лечебной практике. / И.Д. Кароматов, Г.Ф. Махмудова Кизи // Биология и интегративная медицина. – 2016. – № 3. – С. 41-47.
39. Киселева, Т. Л. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества / Т. Л. Киселева, Ю. А. Смирнова. – М. : Профессиональная ассоциация натуротерапевтов, 2009. – 295 с. – Текст : непосредственный.
40. Киселева, Т.Л. Отечественные фармакопейные растения и сырье / Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова, А.А. Карпеев, И.А. Самылина, Е.В. Цветаева, Л.Н. Фролова, О.А. Корвякова // Учебное пособие. – М.: Издательство Профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2009. – 26 с.
41. Козлова, И.В. Кандидоз желудочно-кишечного тракта / И.В. Козлова, Л.И. Лекарева, А.П. Быкова // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2016. – Т.127. – № 3. – С. 40-46.
42. Корулькин, Д.Ю. Природные флавоноиды / Д.Ю. Корулькин, Ж.А. Абилов, Р.А. Музычкина, Г.А. Толстиков // Рос. акад. наук, Сиб. отд., Новосиб. ин-т органической химии. – Новосибирск: Академическое изд-во "Тео". – 2007. – 232 с.
43. Костикова, В. А. Фитохимическое изучение *Atraphaxis frutescens* (L.) C. Koch, произрастающего в Сибири / В. А. Костикова, Т. А. Кукушкина, Д. К. Костиков // Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология. – 2015. – № 4(15). – С. 25-30.
44. Кузнецов, П.В. Именные (цветные) реакции в фармацевтическом и химико-токсикологическом функциональном анализе: учебное пособие / П.В. Кузнецов. – Кемерово: АИ «Кузбассвуиздат», 2016. – 167 с.

45. Куприянова Елена Александровна. «Сравнительное фармакогностическое исследование представителей рода Тополь (*Populus L.*)» : Специальность 14.04.02 "Фармацевтическая химия, фармакогнозия" : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Куприянова Елена Александровна. – Самара, 2020. – 164 с.
46. Куприянова, Е.А., Динамика накопления суммы флавоноидов в листьях тополя черного (*Populus nigra L.*). Е.А. Куприянова, В.А. Куркин. Седьмая научная конференция с международным участием «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения». Сб. науч. трудов, М.: ВИЛАР. – 2019. – С. 208-212.
47. Куркин, В.А. Актуальные аспекты создания импортозамещающих лекарственных растительных препаратов / В.А. Куркин, И.К. Петрухина // Фундаментальные исследования. – 2014. – № 11. – С. 366-371.
48. Куркин, В.А. Основы фитотерапии: учебное пособие: [по специальности 060108 (040500) "Фармация"] / В.А. Куркин. – Самара: ООО «Офорт»; ГОУВПО «СамГМУ», 2009. – С. 492.
49. Куркин, В.А. Производственная практика по стандартизации лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов: Учеб. пособие для студентов фармацев. вузов / В.А. Куркин, В.Б. Браславский, Е.В. Авдеева, О.Е. Правдивцева и др. – Самара: Офорт, 2007. – 126 с.
50. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). 4-е, перераб. и доп. Самара: ООО «Офорт», ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2020. – С. 966-969.
51. Куркина, А.В. Флавоноиды фармакопейных растений. – Самара: ООО «Офорт», ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. – 38-58 с.
52. Куркина, А.В. Экспериментально-теоретическое обоснование подходов к стандартизации сырья и препаратов фармакопейных растений, содержащих флавоноиды: автореф. ... докт. фарм. наук: 14.04.02 / А.В. Куркина. – Самара, 2013. – 48 с.

53. Лаврова, Т.В. Анатомия черешка как источник таксономической информации в группе *Ligusticeae (Umbelliferae-Apioideae)* / Т.В. Лаврова, М.Г. Пименов, В.Д. Тихомиров // Бюл. МОИП. Отд. биол., 1982. – Т. 87. – № 1 – С. 99-111.
54. Ладыгина, Е.Я. Химический анализ лекарственных растений: Учебное пособие для фармацевтических вузов / Е.Я. Ладыгина, Л.Н. Сафронович, В.Э. Отряшенкова и др. Под ред. Гринкевич Н.И., Сафронович Л.Н. – М.: Высш. школа, 1983. – С. 85-86.
55. Лекарственная продукция из натуральных растений [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.lektrava.ru> (дата обращения: 17.12.2021).
56. Литвиненко, А.В. Изучение фенольных соединений листьев дуба обыкновенного (*Quercus robur* L.) / А.В. Литвиненко, Е.В. Бездубная // Материалы VII Международной научно-практической конференции, 2018. – С. 137-140.
57. Литвиненко, А.В. Исследование основных биологически активных веществ водного извлечения листьев дуба обыкновенного (*Quercus robur* L.). В сборнике: Беликовские чтения материалы V Всероссийской научно-практической конференции. – 2017. – С. 193-195.
58. Лотова, Л.И. Ботаника: Морфология и анатомия высших растений: учебник. – 4-е, изд. доп. – М.: Книжный дом «Либроком», 2010. – 512 с.
59. Маевский, П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. 10-е издание / П.Ф. Маевский. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2006. – 184 с.
60. Маевский, П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. 11-е изд. – М.: Товарищество научных изданий КМК, 2014. – 200 с.
61. Макеева, И. М. Применение препарата Стоматофит в комплексном лечении кандидоза слизистой оболочки рта / И. М. Макеева, А. В. Арзуканян // Фарматека. – 2014. – № 6-3. – С. 8-9.
62. Максимовский, Ю. М. Препарат "Стоматофит" в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта / Ю. М. Максимовский, Т. Д. Чиркова, М. А. Ульянова // Современная стоматология. – 2010. – Т. 52. – № 3. – 45 с.

63. Марахова, А.И. Унификация физико-химических методов анализа лекарственного растительного сырья и комплексных препаратов на растительной основе: дис. ... к. фармацев. н.: 14.04.02 / Марахова Анна Игоревна. – Самара, – 2017. – 313 с.
64. Маслий, Ю. С. Изучение качественного состава и количественного содержания макро- и микроэлементов в настойке "Фитодент" и разрабатываемом стоматологическом геле / Ю. С. Маслий, Е. А. Рубан // Вестник фармации. – 2017. – Т. 78. – № 4. – С. 89-93.
65. Меницкий, Ю. Л. Обзор видов рода *Quercus* L. Евразии / Ю.Л. Меницкий // Комаровские чтения, XXXII. Л.: Наука. – 1982. – 60 с.
66. Морозова, Т. В. Фармакогностическое исследование некоторых видов рода боярышник (*Crataegus* L.) : специальность 14.04.02 "Фармацевтическая химия, фармакогнозия" : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Морозова Татьяна Владимировна. – Самара, 2019. – 159 с.
67. Муравьева, Д.А. Фармакогнозия: учебник. – 4-е изд., перераб. и доп. / Д.А. Муравьева, И.А. Самылина, Г.П. Яковлев. – М.: Медицина, – 2002. – С. 620-621.
68. Нарышкина, Н.Н. Морфология пыльцы восточноазиатских представителей рода *Quercus* (*Fagaceae*) / Ботанический журнал. – 2015. – Т. 100. – № 9. – С. 873-885.
69. Немеш, О. М. Применение препаратов "Стоматофит" и "Стоматофит а" в лечении симптоматического гингивита при генерализованном пародонтите второй степени тяжести / О. М. Немеш, И.В. Шиливский, З.М. Гонга, Т.И. Пупин. // Современная стоматология. – 2011. – Т. 57. – № 3. – 69 с.
70. Никитин, А.А. Анатомический атлас полезных и некоторых ядовитых растений / А.А. Никитин, И.А. Панкова. – 1982. – С. 225-228.
71. Носов, А.М. Лекарственные растения официальной и народной медицины: применение в научной и народной медицине: приготовление лекарственных препаратов в домашних условиях / А.М. Носов. – Москва: Эксмо, Н.Новгород: Нижполиграф, – 2005. – 798 с.

72. О состоянии и об охране окружающей среды Российской Федерации в 2020 году. Государственный доклад. – М.: Минприроды России; МГУ имени М.В.Ломоносова, 2021. – 864 с.
73. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. МУК 4.2.1890-04 // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2004. Т.6. – № 4. – С. 306-359.
74. Пастушенков, Л. В. Лекарственные растения. Использование в народной медицине и быту: 5-е изд., перераб. и доп. / Л. В. Пастушенков, А. Л. Пастушенков, В. Л. Пастушенков. — СПб.: БХВ-Петербург, 2012. – С. 432.
75. Пастушенков, Л.В. Лекарственные растения: Использование в народной медицине и быту / Л.В. Пастушенков, А.Л. Пастушенков, В.Л. Пастушенков. – Л.: Лениздат, – 1990. – 384 с.
76. Патент РФ № 2599014 на изобретение «Способ количественного определения стерина в корневищах с корнями крапивы двудомной» / В.А. Куркин, Э.А. Балагозян, О.Е. Правдивцева. № 2015136340/15; заявл. 2015.08.26; опубл. 2015.08.26 // Бюл. № 28. – 5 с.
77. Пешков, В.А. Профилактика осложнений лечения пульпита с использованием экидистеронсодержащей пасты Витадент : специальность 14.00.21 / Пешков Владимир Александрович. – Москва, – 2005.
78. Платонов, В. В. Химический состав органического вещества коры дуба обыкновенного (черешчатого) (*Quercus robur* L, семейство буковые - *fagaceae*) (сообщение III - хлороформный экстракт) / В. В. Платонов, А. А. Хадарцев, Г. Т. Сухих и др. // Клиническая медицина и фармакология. – 2020. – Т. 6. – № 1. – С. 53-56.
79. Платонов, В.В. Хромато-масс-спектрометрия коры дуба обыкновенного-черешчатого (*Quercus robur* L; семейство буковые – *Fagaceae*) / В.В. Платонов, А.А. Хадарцев, Г.Т. Сухих, В.А. Дунаев, Д.А. Мелякова // Вестник новых медицинских технологий, электронный журнал, – 2019. – № 1. – С. 117-133.
80. Потанина, О.Г. Совершенствование стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм из него на основе

микроскопического метода исследования: дисс. ... д. фармац. наук.: 15.00.02/
Потанина Ольга Георгиевна. – М. – 2004. – 424 с.

81. Препаративная жидкостная хроматография» / Под редакцией Б. Бидлигмейера (Перевод с английского д.х.н., профессора О.Г. Ларионова) М.: Мир, – 1990. – 360 с.

82. Рябина, Е.И. Потенциометрическое определение дубильных веществ в лекарственном растительном сырье / Е.И. Рябина, Е.Е. Зотова, Н.И. Пономарева // Фармация. – 2012. – № 2. – С. 8-10.

83. Рябов, Н. А. Методика количественного определения суммы флавоноидов в почках дуба черешчатого *Quercus robur* L. / Н. А. Рябов, В. М. Рыжов, В. А. Куркин // Фармация и фармакология. – 2021. – Т. 9. – № 5. – С. 356-366.

84. Рябов, Н. А. Методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях дуба черешчатого / Н. А. Рябов, В. М. Рыжов // Фармация. – 2021. – Т. 70. – № 2. – С. 24-28.

85. Сальникова, Е. Н. Химическое исследование флавоноидов полыни горькой (*Artemisia absinthium* L.), П. Сиверса (*a. sieversiana* Willd.) и П. якутской (*a. jacutica* Drob.) / Е. Н. Сальникова, Г. И. Калинина, С. Е. Дмитрук // Химия растительного сырья. – 2001. – № 3. – С. 71-78.

86. Самылина, И. А. Гармонизация методических подходов к стандартизации фармакопейных видов растительного сырья, содержащего флавоноиды / И. А. Самылина, Д. В. Моисеев, С. И. Марченко [и др.]. – Текст : непосредственный // Фармация. – 2020. – Т. 69. – № 5. – С. 5-11.

87. Самылина, И. А. Методология исследований по разработке проектов общих фармакопейных статей для Государственной фармакопеи России / И. А. Самылина, И. П. Рудакова. – Текст : непосредственный // Фармация. – 2012. – № 5. – С. 3-5.

88. Самылина, И.А. Фармакогнозия. Атлас: учебное пособие в 2-х томах / И.А. Самылина, О.Г. Аносова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – Т. 2. – С. 364.

89. Сдобнина, Л.И. Диагностические признаки лекарственных растений в петиолярной анатомии. Биоразнообразие: проблемы и перспективы сохранения: Материалы Международной научной конференции, посвященной 135-летию со

дня рождения И.И. Спрыгина. – Пенза: Пензенский государственный педагогический университет им. В.Г. Белинского. – 2008. – 420 с.

90. Соколов, С.Я. Справочник по лекарственным растениям (фитотерапия). Соколов С.Я., Замотаев И.П. - М.: ВИТА. – 1993. – 510 с.

91. Сорокина, А.А. Потенциометрия как метод контроля качества лекарственного растительного сырья, содержащего дубильные вещества, и препаратов на его основе / А.А. Сорокина, А.И. Марахова // Фармация. – 2014. – № 2. – С. 49-52.

92. Стеняева, В.В. Сравнительное фитохимическое исследование лекарственного растительного сырья березы бородавчатой (*Betula verrucosa* Ehrh.): Автореф. дис ... канд. фармац. наук / В.В. Стеняева; Самара. – 2005. – 24 с.

93. Тараховский, Ю.С. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина / Ю.С. Тараховский, Ю.А. Ким, Б.С. Абдрасилова, Е.Н. Музафарова. – Пушино: Synchronobook. – 2013. – 310 с.

94. Терёшкина, О. И. Гармонизация подходов к оценке безопасности состава лекарственных растительных препаратов / О. И. Терёшкина, И. А. Самылина, И. П. Рудакова, И. В. Гравель. – Текст : непосредственный // Биомедицина. – 2011. – № 3. – С. 80-86.

95. Терпило, Н. И. Анатомический атлас лекарственных растений. Харьков, Харьк. научн.-исслед. хим.-фармацевт. ин-т, кн. ф-ка им. Фрунзе. – 1949. – 244 с.

96. Физер, Л. Стероиды / Физер, Л. М. Физер // Пер. с англ. канд. хим. наук М. С. Бурмистровой; Под ред. д-ра хим. наук Н. Н. Суворова, д-ра хим. наук И. В. Торгова. – Москва : Мир. – 1964. – 982 с.

97. Филипенко, Т.А. Антиоксидантное действие экстрактов лекарственных растений и фракций их фенольных соединений / Т.А. Филипенко, Н.Ю. Грибова // Химия растительного сырья. – 2012. – № 1. – С. 77-81.

98. Филипец, Н. Д. Сравнительная оценка нефропротекторных свойств модуляторов калиевых и кальциевых каналов при экспериментальном поражении почек [Текст] / Н. Д. Филипец, А. И. Гоженко // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2014. – Т. 77. - № 1. – С. 10-12.

99. Хадарцев, А. А. Химический состав органического вещества коры дуба обыкновенного (черешчатого) (*Quercus robur* L., семейство буковые - *Fagaceae*) (сообщение V-этанольный экстракт) / А. А. Хадарцев, В. В. Платонов, Г. Т. Сухих и др. // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2020. – № 2. – С. 96-102.
100. Харкевич, Д.А. Фармакология. 10-е изд. М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2010. – 750 с.
101. Хенке, Х. Жидкостная хроматография. Москва: Техносфера. – 2009. – 264 с.
102. Хисямова, Д. М. Сравнительное фармакогностическое исследование некоторых представителей рода лапчатка (*Potentilla* L.) : специальность 14.04.02 "Фармацевтическая химия, фармакогнозия" : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Хисямова Динара Мидхатовна. – Самара, 2017. – 190 с.
103. Хохленкова, Н.В., Технология получения лекарств: Изучение физико-химических свойств и потребительских характеристик перевязочных средств с густым экстрактом коры дуба / Н.В. Хохленкова, Т.Г. Ярных // Вестник фармации. – 2012. Т. 58. – № 4. – С.43-48.
104. Цибина, А. С. Фармакогностическое исследование травы монарды дудчатой (*Monarda fistulosa* L.): специальность 14.04.02 "Фармацевтическая химия, фармакогнозия" : диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук / Цибина Анастасия Сергеевна. – Самара, 2020. – 209 с.
105. Цицин, Н.В. Атлас лекарственных растений СССР / Глав. ред. акад. Н. В. Цицин. – Москва: Медгиз. – 1962. – С. 168-169.
106. Чиков, П.С. Атлас ареалов и ресурсов лекарственных растений СССР / Электронная версия издания: М.: Картография, 1983. – С. 168-169.
107. Шагалиева, Н.Р. Актуальные аспекты разработки и стандартизации стоматологического фитопрепарата «Дентос» / Н.Р. Шагалиева, В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, И.М. Байриков, А.Е. Щербовских // Pharmaceutical sciences, 2013. – № 10. – С. 1490-1494.
108. Шанцер, И.А. Растения средней полосы Европейской части России. Полевой атлас. 2-е изд. М.: Т-во научных изданий КМК, – 2007. – С. 98-99.

109. Шевчук, Д. И. Сравнительная анатомия листьев бука Европейского (*Fagus sylvatica* L.) и дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) / Д. И. Шевчук, В. И. Бойко // Интеграция науки и практики в современном мире: Сборник статей по материалам международной научно-практической конференции, Уфа, 16 сентября 2019 года. – Уфа: Общество с ограниченной ответственностью "Научно-издательский центр "Вестник науки". – 2019. – С. 27-34.
110. Шевчук, Д. И. Сравнительная анатомия однолетнего стебля дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) и бука Европейского (*Fagus sylvatica* L.) / Д. И. Шевчук, В. И. Бойко // Актуальные проблемы лесного комплекса. – 2019. – № 55. – С. 116-119.
111. Эзау, К. Анатомия семенных растений. Книга 1. Под ред. акад. А.Л. Тахтаджяна. Москва. – 1980. – С. 119-144.
112. Andrade, C., Adolfo. Rational Phytotherapy (A Physicians' Guide to Herbal Medicine) / C. Andrade, Adolfo, Volker Schulz, Rudolf Hansel and Varro Tyler // Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. Journal of Ethnopharmacology. – 2001. – 383 p.
113. Andrensek, S. Antimicrobial and antioxidative enrichment of oak (*Quercus robur*) bark by rotation planar extraction using ExtraChrom / B. Simonovska, I. Vovk, P. Fyhrquist, H. Vuorela, P. Vuorela // International journal of food microbiology. – 2004. – Vol. 92, No. 2. – 181– P. 187.
114. Assessment report on *Quercus robur* L., *Quercus petraea* (Matt.) Liebl., *Quercus pubescens* Willd., cortex EMA/HMPC/3206/2009.
115. Bedi, M.K. Herbal Therapy in Dermatology / M.K. Bedi, P.D. Shenefelt // Archives of Dermatology. – 2002. – Vol. 138, No. 2. – P. 237-238.
116. Benyagoub, E. Antimicrobial Effect of *Quercus robur* L. Leaves Selective Extracts from the Mezi Mountain of Djeniene Bourezg (West of Algeria) / E. Benyagoub, N. Nabbou, D. Amal // Current Bioactive Compounds. – 2020. – Vol. 16, No. 8. – P. 1181-1190.
117. Benyagoub, E. The In vitro Evaluation of the Antimicrobial Activity of *Quercus robur* L. Methanolic and Aqueous Leaves' Extracts, from the Algerian High Plateaus

- Against some Uropathogenic Microbial Strains / E. Benyagoub, N. Nabbou, S. Boukhalkhel, I. Dehini // *Phytopathology*. – 2019. – 12 p. doi: 10.29252/qums.12.10.36.
118. Bloch, K. Steroid. – 1989. – Vol. 53, No. 3-5. – P. 261-270.
119. Boratynski, A. Differences in leaf morphology between *Quercus petraea* and *Q. robur* adult and young individuals / A. Boratynski, K. Marcysiak, A. Lewandowska, A. Jasinska, G. Iszkulo, J. Burczyk // *Silva Fennica*. – 2008. – Vol. 42. – No. 1. – P. 115–124.
120. British Pharmacopoeia. 2021 // The British Pharmacopoeia official website : [сайт]. — URL: <https://www.pharmacopoeia.com/BP2021> (дата обращения: 07.11.2021).
121. Bruschi, P. Morphological and Molecular Differentiation between *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. and *Quercus pubescens* Willd. (*Fagaceae*) in Northern and Central Italy / P. Bruschi, G. G. Vendramin, F. Bussotti, P. Grossoni // *Annals of Botany*. – 2000. – Vol. 85, No. 3. – P. 325-333.
122. Bunaciu, A.A. Applications of Differential Spectrophotometry in Analytical Chemistry / A.A. Bunaciu, H. Vu Dang, Y. Hassan Aboul-Enein // *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. – 2013. – Vol. 43, No. 3. – P. 25–130.
123. Bussotti, F. European and Mediterranean Oaks (*Quercus* L.; *Fagaceae*). SEM Characterization of the Micromorphology of the Abaxial Leaf Surface / F. Bussotti, P. Grossoni // *Bot. Zhurn. of the Linnaean Society*. – 1997. – Vol. 124. – P. 183-199.
124. Castola, V. Composition and chemical variability of the triterpene fraction of dichloromethane extracts of cork (*Quercus suber* L.) / V. Castola, A. Bighelli, S. Rezzi, G. Melloni, S. Gladiali, J.M. Desjobert, J. Casanova // *Industrial Crops and Products*. – 2002. – No. 15. – P. 15-22.
125. Celano, R. Specialized metabolite profiling of different *Glycyrrhiza glabra* organs by untargeted UHPLC-HRMS / R. Celano, T. Docimo, A. Piccinelli, S. Rizzo, L. Campone, R. Di Sanzo, S. Carabetta, L. Rastrelli, M. Russo // *Industrial Crops and Products*. – 2021. – Vol. 170. – P. 1-11.

126. Cushnie, T.P. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids / T.P. Cushnie, A.J. Lamb // *Int. J. Antimicrob. Agents*. – 2011. Vol. 38. – P. 99–107.
127. Dasgupta, A. Chapter 10 - Therapeutic drug monitoring of antimicrobial, antifungal and antiviral agents / A. Dasgupta, M.D. Krasowski // *Therapeutic Drug Monitoring Data (Fourth Edition)*. Academic Press. – 2020. – P. 159-197.
128. Drózdź, P. Assessment of polyphenol content and antioxidant activity of oak bark extracts / P. Drózdź, K. Pyrzyńska // *European Journal of Wood and Wood Products*. – 2017. – Vol. 76. – P. 793-795.
129. Eaton, E. *Quercus robur* and *Quercus petraea* in Europe: distribution, habitat, usage and threats / E. Eaton, G. Caudullo, S. Oliveira, D. de Rigo. – 2016. – P. 162–163.
130. Elansary, O. H. Polyphenol Profile and Pharmaceutical Potential of *Quercus* spp. Bark Extracts / O.H. Elansary, A. Szopa, P. Kubica, H. Ekiert, A. Mattar M, M.A. Al-Yafrasi, et al. // *Plants*. – 2019. – Vol. 8, No. 11. – 486 p.
131. Esposito, F. Impact of metal accumulation on *Quercus ilex* L. leaf traits. F. Esposito, V. Memoli, S.C. Panico, M. Trifuoggi, N. Di, Gabriella, Maisto, Giulia. *Plant and Soil*. – 2019. – Vol. 436, No. 12. – P. 517-526.
132. European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition // EDQM – European Directorate for the Quality of Medicines: [сайт]. – URL: <https://www.edqm.eu/en/european-pharmacopoeia-ph-eur-10th-edition> (дата обращения: 07.11.2021).
133. Fatehi, S. Evaluation of antimicrobial and Anti-quorum sensing activity of mazouj and ghalghaf galls extracts of oak against *Pseudomonas aeruginosa* / S. Fatehi, M. Mohammadi Sichani, M. Tavakoli // *Qom Univ Med Sci J*. – 2018. – Vol. 12. – No. 10. – P – 36-45.
134. Flora of North America Web Site [Электронный ресурс] // Режим доступа: http://www.efloras.org/florataxon.aspx?flora_id=1&taxon_id=242417084 (дата обращения: 17.12.2021).
135. Fölster-Holst, R. Synthetic Tannins in Dermatology – A Therapeutic Option in a Variety of Pediatric Dermatoses / R. Fölster-Holst, E. Latussek // *Pediatric Dermatology*. – 2007. – Vol. 24. – No. 3. – P. 296–301.

136. Fortini, P. Differentiation and hybridization of *Quercus frainetto*, *Q. petraea*, and *Q. pubescens* (*Fagaceae*): insights from macro-morphological leaf traits and molecular data / P. Fortini, P. Di Marzio, R. Di Pietro // *Plant Syst Evol.* – 2015. – Vol. 301. – P. 375–385.
137. Golus, J. The agar microdilution method – a new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts / J. Golus, R. Sawicki, J. Widelski, G. Ginalska // *J Appl Microbiol.* – 2016. – Vol. 121. – P. 1291-1299.
138. González-Rodríguez, A. Leaf morphometric variation in *Quercus affinis* and *Q. laurina* (*Fagaceae*), two hybridizing Mexican red oaks / A. González-Rodríguez, K. Oyama // *Botanical Journal of the Linnean Society.* – 2005. – Vol. 147. – No. 4. – P. 427–435.
139. Goun, E. & P. Anticancer and antithrombin activity of Russian plants / E. Goun, P. Goun, V. Solodnikov, S. Suhinina, T. Kline, M. Cunningham, G. Nguyen, C. Miles, Howard // *Journal of Ethnopharmacology.* – 2002. – Vol. 81. – P. 337-342.
140. Grotewold, E. *The Science of Flavonoids*. New York: Springer. – 2006. – 35 p.
141. Herbarium Department for Ecology, Botany and Nature Protection Faculty of Biology, Samara University. SMR-1547. [Электронный ресурс]: URL: <http://sweetgum.nybg.org/science/vh/collection-index/collection-indexdetails/?irn=>
142. Hoste, E. A. J. Assessment of renal function in recently admitted critically ill patients with normal serum creatinine / E. A. J. Hoste, J. Damen, R. C. Vanholder, N. H. Lameire, J. R. Delanghe, K. Van den Hauwe, F. A. Colardyn // *Nephrology Dialysis Transplantation.* – 2005. – Vol. 20. – No. 4. – P. 747–753.
143. Huidobro E JP, Tagle R, Guzmán AM. Creatinina y su uso para la estimación de la velocidad de filtración glomerular [Estimation of glomerular filtration rate with creatinine] / E. JP. Huidobro, R. Tagle, A. M. Guzmán // *Rev Med Chil*. Spanish. – 2018. – Vol. 146. – No. 3. – P. 344-350.
144. International Plant Names Index (IPNI). The Royal Botanic Gardens, Kew, Harvard University Herbaria & Libraries and Australian National Botanic Gardens. [Электронный ресурс] // Режим доступа: <https://www.ipni.org/n/296137-1> (Дата обращения 18 декабря 2021 г.).

145. Ivanov, M. Revealing the astragalin mode of anticandidal action / M. Ivanov, A. Kannan, D. Stojkovic, J. Glamoclija, S. Golic Grdadolnik, D. Sanglard, M. Sokovic // EXCLI J. – 2020. – Vol. 29. – No. 19. – P. 1436-1445.
146. Jörg, P. Characterization of an Isoprene Synthase from Leaves of *Quercus petraea* (Mattuschka) Liebl. / Jörg-P. Schnitzler, A. Schnitzler, R. Steinbrecher, A. Rainer, Lehning // Botanica Acta. – 1996. – No. 109. – P. 216-221.
147. Kenny, L. *Quercus muehlenbergii* / L. Kenny, K. Wenzell, D. Jerome // The IUCN Red List of Threatened Species. – 2017: e.T194202A111279204.
148. Kosanić, M. Screening of antimicrobial activity of Some lichen Species In vitro / M. Kosanić, R. Kosanić, B. Kragujevac // J. Sci. UDC. – 2010. – Vol. 3229. – P. 65-72615.
149. Kryvoruchko, A. Anatomical leaves characteristics of *Quercus rubra* L. and *Quercus robur* L. and stand density / A. Kryvoruchko, V. Bessonova // Ukrainian Journal of Ecology. – 2017. – No. 8. – P. 64-71.
150. Kumar, A. Exploration of Medicinal Plants as Sources of Novel Anticandidal Drugs / A. Kumar, F. Khan, D. Saikia // Curr Top Med Chem. – 2019. – Vol. 19. – No. 28. – P. 2579-2592.
151. Lysiuk, R. Differential Spectrophotometry: Application for Quantification of Flavonoids in Herbal Drugs and Nutraceuticals Editorial / R. Lysiuk, N. Hudz // International Journal of Trends in Food and Nutrition. – 2017. – Vol. 1. – 102 p.
152. Mabry, T.J. The systematic identification of flavonoids / T.J. Mabry, K.R. Markham, M.B. Thomas // Journal of Molecular Structure, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, – 1970. – Vol. 10. – No. 2. – P. 320-320.
153. Makarova, N. Influence of extraction technology on the content of phenols, flavonoids and antioxidant activity for hips (*Rosa* L.), Oak bark (*Quercus robur* L.), root *Rhena* (*Rheum officinale*), Ginseng root (*Panax* L.), buds birch (*Betula* L.) / N. Makarova, D. Ignatova, N.B. Ereemeeva // Chemistry of plant raw material. – 2020. – P. 271-278.
154. Milton Prabu, S. Quercetin: a flavonol with universal therapeutic use and its interactions with other drugs / S. Milton Prabu // Fitoterapia. – 2019. – Vol. 106. – P. 256-71.

155. Nugroho, A. HPLC analysis of Phenolic Substances and Anti-Alzheimer's Activity of Korean *Quercus* Species / A. Nugroho, B.-M. Song, S. H. Seong, J. S. Choi, J. Choi, J.-Y. Choi, H.-J. Park // Natural Product Sciences. – 2016. – Vol. 22. – No. 4. – 299 p.
156. Okuda, T. Systematics and health effects of chemically distinct tannins in medicinal plants / T. Okuda // Phytochemistry. – 2005. – No. 66. – P. 2012–2031.
157. Pailhoriès, H. Oak in Hospitals, the Worst Enemy of *Staphylococcus aureus*? / H. Pailhoriès, M.T. Munir, F. Aviat, M. Federighi, C. Belloncle, M. Eveillard // Infection Control & Hospital Epidemiology. – 2017. – Vol. 38. – No. 3. – P. 382–384.
158. Pérez, A.J. Triterpenoid Components from Oak Heartwood (*Quercus robur*) and Their Potential Health Benefits / A.J. Pérez, L. Pecio, M. Kowalczyk, R. Kontek, G. Gajek, L. Stopinsek, et al. // Journal of agricultural and food chemistry. – 2017. – P. 4611-4623.
159. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). [Электронный ресурс] URL: Available online: <https://clsi.org/standards/products/microbiology/documents/m02/> (accessed June 12, 2021).
160. Physicians' desk reference for Herbal Medicines. *Quercus robur* Oak. – 2000-2004. – P. 800-801.
161. Rao, N. In vitro phytochemical screening, antioxidant & antimicrobial activity of the methanolic extract of *Quercus infectoria* L. / N. Rao, S. Mittal, E. Menghani // International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences. – 2013. – Vol. 5. – P. 273-277.
162. Ryabov, N.A. Anatomical and morphological study of the buds of the *English oak Quercus robur* L. / N.A. Ryabov, V.M. Ryzhov, L.V. Tarasenko, A.A. Sokhina // Pharmaceutical botany: modernity and prospects: Collection of materials. FSBEI HE Samara State Medical University of the Ministry of Health of Russia; Edited by V.A. Kurkin. – Samara. – 2017. – P. – 149-158 (In Russ.).

163. Ryabov, N.A. Determination of the antimicrobial activity of alcoholic extracts of the bark and buds of *English oak* / N.A. Ryabov, V.A. Kurkin, V.M. Ryzhov, et al. // Postgraduate Bulletin of the Volga Region. – 2020. – No. 1-2. – P. 152-157. (In Russ.).
164. Sanchez-Burgos, J. Antioxidant, antimicrobial, antitopoisomerase and gastroprotective effect of herbal infusions from four *Quercus* species / J. Sanchez-Burgos, M. Ramírez-Mares, M. Larrosa, J. Gallegos-Infante, R. González-Laredo, L. Medina-Torres, et al. // Industrial Crops and Products. – 2013. – Vol. 42. – P. 57-62.
165. Sarwar, R. Isolation and Characterization of Two New Antimicrobial Acids from *Quercus incana* (Bluejack Oak) / R. Sarwar, U. Farooq, S. Naz, N. Riaz, S. Majid Bukhari, A. Rauf, et al. // Biomed Res Int. – 2018. – Vol. 37. – P. 98-105.
166. Scalbert, A. Polyphenols and chemical defence of the leaves of *Quercus robur* / A. Scalbert, H. Edwin // Phytochemistry. – 1987. – No. 26. – P. 3191-3195.
167. Smailagić, A. Radical Scavenging and Antimicrobial Properties of Polyphenol Rich Waste Wood Extracts / A. Smailagić, P. Ristivojević, I. Dimkić, T. Pavlović, D. Dabić Zagorac, S. Veljović, et al. // Foods. – 2020. – No. 9. – P. 319.
168. Şöhretoğlu, D. The polyphenolic profile of Oak (*Quercus*) species: a phytochemical and pharmacological overview / D. Şöhretoğlu, G. Renda // Phytochem Rev 19. – 2020. – P. 1379–1426.
169. Tanaka, H. “Antibacterial Activity of Isoflavonoids” Isolated from *Erythrina variegata* against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* / H. Tanaka, M. Sato, S. Fujiwara // Left Applied Microbiology. – 2002. – Vol. 35. – P. 494-498.
170. Wang, Z. The flavonoid Astragalin shows anti-tumor activity and inhibits PI3K/AKT signaling in gastric cancer / Z. Wang, J. Lv, X. Li, Q. Lin // Chem Biol Drug Des. – 2021. – Vol. 98. – No. 5. – P. 779-786.
171. Wrzeciono, U. Trojterpeny i sterole roślinne: Trojterpeny pięciocykliczne z bebu szypulkowego *Quercus robur* L. // Roczn. Chem. – 1963. Vol. 37. – P. 1457-1462.
172. Xu, F. Habitat effects on leaf morphological plasticity in *Quercus acutissima*. / F. Xu // Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica. – 2008. – Vol. 50. – P. 19-26.

173. Xu, N. Hierarchy of plasticity traits in responses of *Quercus aliena* to light conditions and water availability / N. Xu, W. Xu, Renqing & Liu, Jian & Lu, Penglin & Guo, Weihua // *Dendrobiology*. – 2015. Vol. 74. – P. 169-180.
174. Yücedağ, C. Morphological and genetic variation within and among four *Quercus petraea* and *Q. robur* natural populations / C. Yücedağ, O. Gailing // *Turk J. Bot.* – 2013. Vol. 37. – P. 619-629.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ДИССЕРТАЦИИ

КОЕ/мл – Колониеобразующие единицы

МИК – Минимальная ингибирующая концентрация

МУ – Методические указания;

ХЧ – Химически чистый

$\bar{x}$ – среднее значение выборки

a – свободный член линейной зависимости

b – угловой коэффициент линейной зависимости

ϵ – относительные ошибки результата отдельного определения и среднего результата

F – значение F-критерия Фишера

f – число степеней свободы

P – доверительная вероятность

r – коэффициент корреляции

S – стандартное отклонение среднего результата

S² – дисперсия

t – критерий Стьюдента

Δ – разность некоторых величин;

Δx – полуширина доверительного интервала величины

Σ – знак суммирования (сумма);

x, y – текущие координаты в уравнении линейной зависимости

CLSI – Институт клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute)

MRSA – Метициллинрезистентный золотистый стафилококк (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)

Q. – *Quercus*

SMR-1547 – Индексный гербарий Самарского государственного университета, кафедра экологии, ботаники и охраны природы, биологического факультета (Index Herbarium of the Samara State University, Department for Ecology, Botany and Nature Protection Faculty of Biology)

ATCC – Американская коллекция типовых культур (American Type Culture Collection)

«Утверждаю»

«Центр контроля качества
лекарственных средств
Самарской области»

июля 2020 г.



Члены комиссии:

Л.Е. ЖНЯКИНА

Власова Г.И. ВЛАСОВА

 Е.Е. МИРОНОВА

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор

ООО «Лекарь»

Бобров Д.Ю.

« 20 » 04

2021 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов диссертационного исследования Рябова Николая Анатольевича «Фармакогностическое исследование дуба черешчатого (*Quercus robur* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» в ООО «Лекарь»

Результаты диссертационной работы Рябова Н.А., посвященные фармакогностическому исследованию дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), разработке методик количественного определения содержания биологически активных соединений, а также обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе. В основе разработанных методик лежат методологические подходы, предусматривающие использование морфолого-анатомического анализа, ТСХ и УФ-спектроскопии, ВЭЖХ методов с использованием стандартных образцов. Методики определения подлинности, а также методики определения суммы флавоноидов в коре, листьях, почках, желудях дуба черешчатого воспроизводимы и удобны в работе.

Таким образом, внедренные результаты диссертационной работы Рябова Н.А., посвященные фармакогностическому исследованию дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), используются в рабочем процессе ООО «Лекарь» и способствуют стандартизации ЛРС на этапах приемки, производства и хранения; научному обоснованию целесообразности и объективности использования современных подходов контроля качества и стандартизации по показателям наличия основных групп биологически активных веществ (подлинности) и их количественного содержания.

Главный технолог
ООО «Лекарь»

« 20 » 04 2021 г.

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Самарская фармацевтическая
фабрика»

 М.С. Глебов
« 15 » 12 2021 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов диссертационного исследования Рябова Николая Анатольевича
«Фармакогностическое исследование дуба черешчатого (*Quercus robur* L.)» на соискание
ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 –
«Фармацевтическая химия, фармакогнозия» в ООО «Самарская фармацевтическая
фабрика»

Результаты диссертационной работы Рябова Н.А., посвященные фармакогностическому исследованию дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), разработке методик количественного определения содержания биологически активных соединений, а также обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе. В основе разработанных методик лежат методологические подходы, предусматривающие использование морфолого-анатомического анализа, ТСХ и УФ-спектроскопии, ВЭЖХ методов с использованием стандартных образцов. Методики определения подлинности, а также методики определения суммы флавоноидов в коре, листьях, почках, желудях дуба черешчатого воспроизводимы и удобны в работе.

Таким образом, внедренные результаты диссертационной работы Рябова Н.А., посвященные фармакогностическому исследованию дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), используются в рабочем процессе ООО «Самарская фармацевтическая фабрика» и способствуют стандартизации ЛРС на этапах приемки, производства и хранения; научному обоснованию целесообразности и объективности использования современных подходов контроля качества и стандартизации по показателям наличия основных групп биологически активных веществ (подлинности) и их количественного содержания.

Главный технолог
ООО «Самарская фармацевтическая фабрика»



Д.С. Зуев

« 15 » 12 2021 г.

“Утверждаю”
 Генеральный директор
 ЗАО «Самаралектравы»
 _____ Н.Д. ЛУЖНОВ
 “ _____ ” _____ 2022 г.



АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Рябова Николая Анатольевича
 «Фармакогностическое исследование дуба черешчатого (*Quercus robur* L.)» на
 соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности
 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) в ЗАО
 «Самаралектравы»

Комиссия в составе сотрудников ЗАО «Самаралектравы»: зав. производством ЗАО «Самаралектравы» А.Н. Загорянского, главного инженера А.В. Никитенкова подтверждает использование материалов диссертационного исследования Рябова Н.А., посвященного изучению химического состава, вопросов фитохимической и морфолого-анатомической диагностики, разработке и обоснованию подходов к стандартизации новых видов лекарственного растительного сырья – «Дуба черешчатого листа» и «Дуба черешчатого почки» в работе предприятия.

Разработанные методики качественного и количественного анализа, данные морфолого-анатомического исследования сырья дуба черешчатого апробированы в процессе работы предприятия. Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации сырья и лекарственных препаратов на основе дуба черешчатого.

Члены комиссии:

Заведующий производством
 ЗАО «Самаралектравы»



А.Н. ЗАГОРЯНСКИЙ

Главный инженер ЗАО «Самаралектравы»



А.В. НИКИТЕНКОВ

446554, Самарская область., Сергиевский район, с. Антоновка, ул. Полевая, д. 19А

“Утверждаю”

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук, профессор

И.Л. Давыдкин

_____ 2022 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы
Рябова Николая Анатольевича «Фармакогностическое исследование дуба
черешчатого (*Quercus robur* L.)» на соискание ученой степени кандидата
фармацевтических наук по специальности 3.4.2. фармацевтическая химия,
фармакогнозия (фармацевтические науки) на кафедре фармацевтической
технологии с курсом биотехнологий ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармацевтической технологии с курсом биотехнологий: зав. кафедрой, доцента, д.фарм.н. А.В. Куркиной, профессора, д.фарм.н. С.В. Первушкина, доцента, к.фарм.н. Л.Д. Климовой, с подтверждает использование материалов научно-исследовательской работы Рябова Н.А., посвященной изучению химического состава и обоснованию использования в медицине лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов на основе дуба черешчатого (*Quercus robur* L.), в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами, а также в научно-исследовательской работе в области технологических исследований по производству лекарственных препаратов на основе данного растения.

Используемые при этом результаты изучения химического состава, а также разработанные подходы к стандартизации сырья являются методической и методологической основой для научного обоснования ресурсосберегающих технологий.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой фармацевтической технологии
с курсом биотехнологий
д. фарм. н., доцент



А.В. Куркина

Профессор кафедры фармацевтической технологии
с курсом биотехнологий
д. фарм. н., профессор



С.В. Первушкин

Доцент кафедры фармацевтической технологии
с курсом биотехнологий
к. фарм. н., доцент



Л.Д. Климова

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук, профессор

И.Л. Давыдкин

“ 20 ” 01 2022 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов диссертационной работы
Рябова Николая Анатольевича «Фармакогностическое
исследование дуба черешчатого (*Quercus robur* L.)» на соискание
ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности
3.4.2. фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки)
на кафедре химии Института фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава
России

Комиссия в составе сотрудников кафедры химии Института фармации: зав. кафедрой, доцента, д.фарм.н. Воронина А.В., доцента кафедры, к.хим.н., доцента Шариповой С.Х., доцента кафедры, к.биол.н., доцента Расцветовой Н.В. подтверждает использование материалов диссертационного исследования Рябова Н.А., посвященной изучению химического состава, определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами, а также в научно-исследовательской работе в области изучения лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды.

Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации лекарственных препаратов на основе лекарственного растительного сырья дуба черешчатого.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой химии Института фармации,
д. фарм. н., доцент

 А.В. Воронин

Зав.уч. кафедры химии Института фармации,
к. хим. н., доцент

 С.Х. Шарипова

Доцент кафедры химии Института фармации,
к. биол. н., доцент

 Н.В. Расцветова

“Утверждаю”

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук, профессор

И.Л. Давыдкин

“ 11 ” 2022 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов диссертационной работы

Рябова Николая Анатольевича «Фармакогностическое исследование дуба черешчатого (*Quercus robur* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) на кафедре управления и экономики фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры управления и экономики фармации: зав. кафедрой управления и экономики фармации, доцента, д. фарм. н. И. К. Петрухиной, профессора кафедры, д. фарм. н., доцента Е. П. Гладуновой, доцента, к. фарм. н. Е. Л. Абдулмановой подтверждает использование материалов исследования Рябова Н.А., посвященного изучению химического состава и разработке подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья дуба черешчатого (*Quercus robur* L.) в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами, а также в научно-исследовательской работе.

Внедренные результаты способствуют научному обоснованию целесообразности создания конкурентоспособных лекарственных препаратов, обладающих диуретическим и противомикробным действием, в том числе импортозамещающих препаратов.

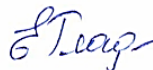
Члены комиссии:

Зав. кафедрой управления
и экономики фармации
д. фарм. н.



И.К. Петрухина

Профессор кафедры управления
и экономики фармации
д. фарм. н.



Е.П. Гладунова

Доцент кафедры управления
и экономики фармации
к. фарм. н.



Е.Л. Абдулманова

“Утверждаю”

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук, профессор
И.Л. Давыдкин
“*И.Л. Давыдкин*” 2022 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы
Рябова Николая Анатольевича «Фармакогностическое исследование дуба
черешчатого (*Quercus robur* L.)» на соискание ученой степени кандидата
фармацевтических наук по специальности 3.4.2. фармацевтическая химия,
фармакогнозия (фармацевтические науки) на кафедре фармакогнозии с ботаникой
и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармакогнозии с ботаникой и
основами фитотерапии: зав. кафедрой, профессора, д.фарм.н. Куркина В.А.,
зав.уч. кафедры, доцента, д.фарм.н. Правдивцевой О.Е., доцента, к.фарм.н.
Рыжова В.М. подтверждает использование материалов диссертационного
исследования Рябова Н.А., посвященного изучению вопросов фитохимической и
морфолого-анатомической диагностики, обоснованию подходов стандартизации
лекарственного сырья и препаратов на основе дуба черешчатого (*Quercus robur*
L.) в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и
ординаторами и в научно-исследовательской работе. Внедренные результаты
способствуют повышению объективности стандартизации лекарственного
растительного сырья.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
д. фарм. н., профессор

В.А. Куркин В.А. Куркин

Зав.уч. кафедры фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
д. фарм. н., доцент

О.Е. Правдивцева О.Е. Правдивцева

Доцент кафедры фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
к. фарм. н., доцент

В.М. Рыжов В.М. Рыжов

Приложение 2. Патенты по теме диссертационного исследования
Патент на изобретение «Способ количественного определения суммы
флавоноидов в листьях дуба черешчатого»



Справка на приоритет изобретения РФ «Способ получения настойки листьев дуба черешчатого, обладающей антимикробной активностью»

Форма № 94 ИЗ,ПМ,ПО-2016

Федеральная служба по интеллектуальной собственности
Федеральное государственное бюджетное учреждение



«Федеральный институт промышленной собственности»
(ФИПС)

Бережковская наб., д. 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП - 3, 125993

Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЕМЕ И РЕГИСТРАЦИИ ЗАЯВКИ

25.10.2021 <i>Дата поступления (дата регистрации)</i>	W21066027 <i>Входящий №</i>	2021131123 <i>Регистрационный №</i>
---	---------------------------------------	---

ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ (дата регистрации) претензия изобретения		(21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ №	ВХОДЯЩИЙ №
(85) ДАТА ПЕРЕВОДА (необязательное поле, не указывается при фпс)			
☐ (186) (предварительный запрос, предварительный патент и другие предварительные заявки, зарегистрированные в иностранных государствах) ☐ (187) (патент и заявки, зарегистрированные в иностранных государствах) ☐ (196) (патент, зарегистрированный в иностранном государстве) ☐ (197) (патент и заявки, зарегистрированные в иностранном государстве)		АДРЕС ДЛЯ ПЕРИПИСКИ (полный адрес, включая и название для корреспонденции) 643099, г. Самара, Чкаловский, 89, Андрушова Ольга Валерьевна (443099, g. Samara, Chkalovskiy, 89, Andrusova Olga Valeriyevna) Телефон: 89171555552 Факс: Адрес электронной почты: o.a.andrusova@yandex.ru АДРЕС ДЛЯ СКАРЕТНОЙ ПЕРИПИСКИ (не указывается при подаче заявки на изобретение)	
ЗАЯВЛЕНИЕ о выдаче патента Российской Федерации на изобретение		В Федеральную службу по интеллектуальной собственности Бережковская наб., д. 30, корп. 1, г. Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация	
(54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ Способ получения настойки листьев дуба черешчатого, обладающей антимикробной активностью			
(71) ЗАЯВИТЕЛЬ (фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) физического лица или наименование юридического лица (полное наименование юридического лица в полном объеме) Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации» (Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Samara State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation) 443099, г. Самара, ул. Чкаловский, д. 89. (443099, g. Samara, ul. Chkalovskiy, d. 89.)		ИДЕНТИФИКАТОРЫ ЗАЯВИТЕЛЯ ОГРН 1026301426348 КПП 631701005 ИНН 6317002858 СНИЛС ДОКУМЕНТ (серия, номер) КОД СТРАНЫ (код из таблицы)	
☐ изобретение создано за счет средств федерального бюджета Заявитель является: ☐ государственным учреждением ☐ муниципальным учреждением выполняющей работ (указывать наименование) ☐ исполнителем работ по: ☐ государственному контракту ☐ муниципальному контракту выполняющим работ (указывать наименование) Контракт от №			
(74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(Ы) ЗАЯВИТЕЛЯ (фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) физического лица или наименование юридического лица (полное наименование юридического лица в полном объеме) или наименование юридического лица в полном объеме) (указывать наименование юридического лица или наименование физического лица)		☐ патентный поверенный ☒ представлять по доверенности ☐ представлять по закону	

Общее количество документов в листах	21	Лицо, зарегистрировавшее документы
Из них: - количество листов комплекта изображений изделия (для промышленного образца)		Автоматизированная система
Количество платежных документов	1	
Сведения о состоянии делопроизводства по заявкам размещаются в Открытых реестрах на сайте ФИПС по адресу: www.fips.ru/register-web		

Справка на приоритет изобретения РФ «Способ количественного определения суммы флавоноидов в почках дуба черешчатого»

Форма № 94 ИЗ,ПМ,ПО-2016

Федеральная служба по интеллектуальной собственности
Федеральное государственное бюджетное учреждение



«Федеральный институт промышленной собственности»
(ФИПС)

Бережковская наб., д. 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП - 3, 125993

Телефон (8-499) 240-60-15 Факс (8-495) 531-63-18

УВЕДОМЛЕНИЕ О ПРИЕМЕ И РЕГИСТРАЦИИ ЗАЯВКИ

25.10.2021 <i>Дата поступления (дата регистрации)</i>	W21066025 <i>Входящий №</i>	2021131121 <i>Регистрационный №</i>
---	---------------------------------------	---

ДАТА ПОСТУПЛЕНИЯ (дата регистрации) оригиналов документов заявки		(21) РЕГИСТРАЦИОННЫЙ №	ВХОДЯЩИЙ №
☐ (86) (государственный изобретательский патент и другие виды изобретений) патент, изобретение, полезное изобретение		АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ (полный адрес, включая индекс и наименование организации) 443099, г. Самара, Чапаевская, 89, Андреева Ольга Валерьевна (443099, g. Samara, Chapayevskaya, 89, Andreeva Olga Valeryevna)	
☐ (87) (патент и другие виды изобретений) патент, изобретение, полезное изобретение		Телефон: 89171555551 Факс: Адрес электронной почты: o.v.andreeva@samstu.ru	
☐ (96) (патент изобретения) патент, изобретение, полезное изобретение		АДРЕС ДЛЯ СЕКРЕТНОЙ ПЕРЕПИСКИ (указывается при подаче заявки на секретные изобретения)	
☐ (97) (патент и другие виды изобретений) патент, изобретение, полезное изобретение			
ЗАЯВЛЕНИЕ о выдаче патента Российской Федерации на изобретение			
В Федеральную службу по интеллектуальной собственности Бережковская наб., д. 30, корп. 1, г. Москва, Г-59, ГСП-3, 125993, Российская Федерация			
(54) НАЗВАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ Способ количественного определения суммы флавоноидов в почках дуба черешчатого			
(71) ЗАЯВИТЕЛЬ (фамилия, имя, отчество (последнее – при наличии) физического лица или наименование юридического лица (состоящего учредительскому документу), место жительства или место нахождения, наименование страны и почтовый индекс) Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education «Samara State Medical University» of the Ministry of Healthcare of the Russian Federation) 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, д.89. (443099, g. Samara, ul. Chapayevskaya, d.89.)		ИДЕНТИФИКАТОРЫ ЗАЯВИТЕЛЯ ОГРН 1026301426348 КПП 63 17 01 001 ИНН 63 17 002858 СНИЛС ДОКУМЕНТ (серия, номер) КОД СТРАНЫ (если он установлен) RU	
☐ изобретение создано за счет средств федерального бюджета Заявитель является: ☐ государственным заказчиком ☐ муниципальным заказчиком исполнителя работ (указать наименование) ☐ исполнителем работ по: ☐ государственному контракту ☐ муниципальному контракту заказчик работ (указать наименование) Контракт от №			
(74) ПРЕДСТАВИТЕЛЬ(И) ЗАЯВИТЕЛЯ (указывается фамилия, имя, отчество полностью – при наличии) лица, наделенного законными полномочиями для подачи или получения документов от его имени в Федеральную службу по интеллектуальной собственности или являющегося таковым в силу закона)		☐ патентный поверенный ☒ представитель по доверенности ☐ представитель по закону	

Общее количество документов в листах	33	Лицо, зарегистрировавшее документы
Из них: - количество листов комплекта изображений изделия (для промышленного образца)		Автоматизированная система
Количество платежных документов	1	
Сведения о состоянии делопроизводства по заявкам размещаются в Открытых реестрах на сайте ФИПС по адресу: www.fips.ru/registers-web		

Приложение 3. Гербарные образцы изучаемых видов листьев рода *Quercus*

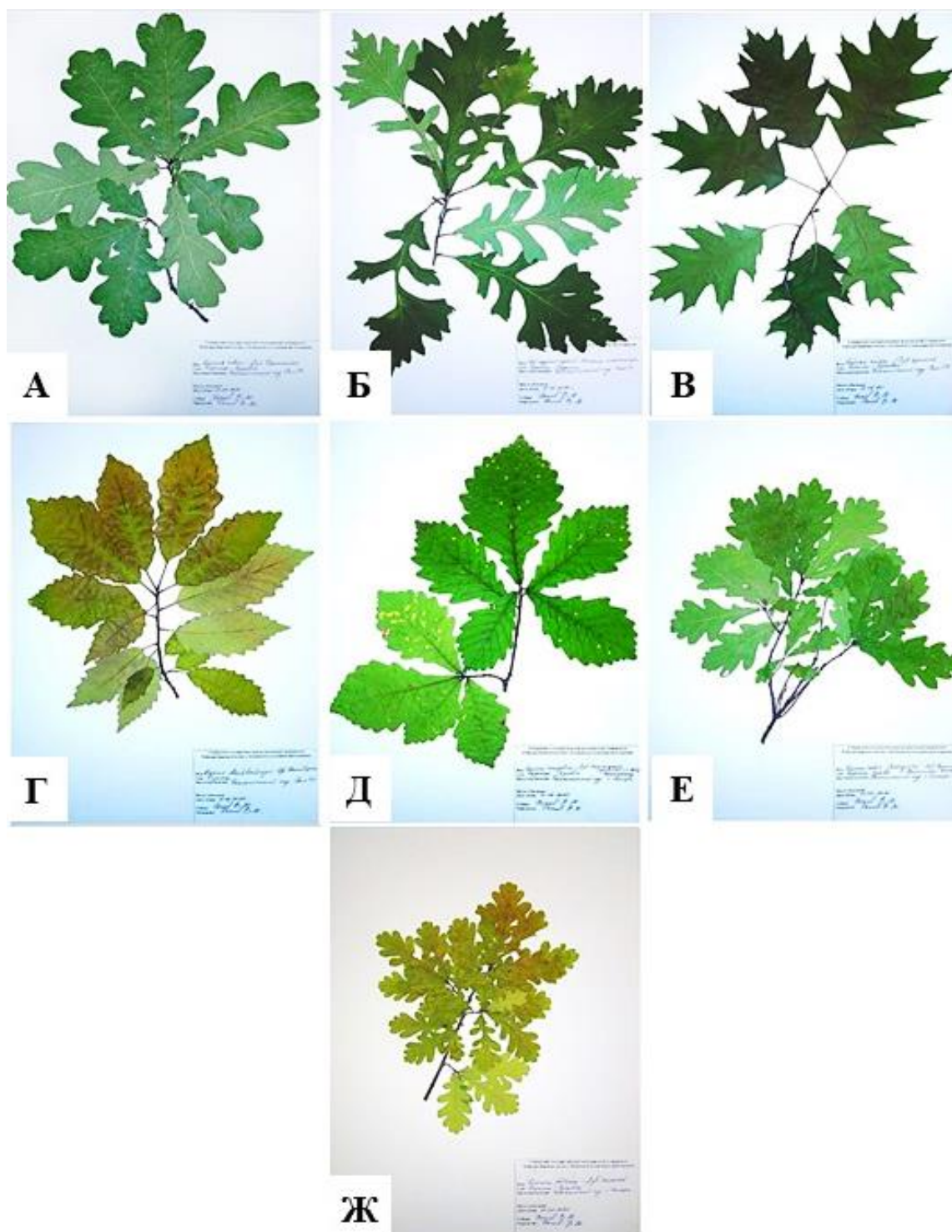


Рисунок 4 – Гербарные образцы представителей рода *Quercus* L.: А – Дуб черешчатый – *Q. robur* L.; Б – Дуб крупноплодный – *Q. macrocarpa* Michaux; В – Дуб красный – *Q. rubra* L.; Г – Дуб Мюлленберга – *Q. Muehlenbergii* Engelmann.; Д – Дуб монгольский – *Q. mongolica* Fisch. ex Ledeb.; Е – Дуб летний фастигиата – *Q. robur* var. *fastigiata* (Lam.) Spach.; Ж – Дуб скальный – *Q. petraea* Liebl.

Таблица 2 – Сравнительный морфологический анализ листьев представителей
рода *Quercus* L.

№	Диагностические признаки		<i>Quercus robur</i> L.	<i>Quercus pétraea</i> (Matt.) Liebl.	<i>Quercus 'fastigiata'</i>	<i>Quercus Muehlenbergi</i> Engelm.
1.	Размеры листовых пластинок	Длина, см	10-16	6 -12	7-12	10-86
		Ширина, см	6-9	3-8	5-7	5-12
3.	Тип листа		Простой, черешковый	Простой, черешковый	Простой, черешковый	Простой, черешковый
4.	Форма листовой пластинки		Продолговато-обратнояцевидная, перисто-лопастная, часто с ушками у основания листа	Продолговато - обратнояцевидная, перисто-лопастная, глубоко и неправильно лопастные	Продолговато-обратнояцевидная, перисто-лопастная	Обратнояцевидные или обратноланцетные
5.	Край листовой пластинки		Волнистый	Цельно крайние, крупно зубчатые, удлинённые, тупые, неравные	Волнистый	Остро пильчатые
6.	Цвет листа верхней стороны		Сизо-зелёные, темные, матовые	Ярко-зелёные	Светло-зеленые, блестящие	Желтовато-зеленые
7.	Цвет листа нижней стороны		Желтоватые или зелёные, со светлыми жилками	Бледно-зеленые	Бледно-зеленые	Беловатые, светло-зеленые
8.	Строение листовой пластинки		Лопастные тупые, округлые, вырезы между ними неглубокие. Лопастей листа 4-6, реже 8 пар, они тупые,	Лопастные округлые, наиболее крупные в средней части пластинки, удлиненные, почти голые	Лопастные округлые, наиболее крупные в средней части пластинки, удлиненные, почти голые	От обратнояцевидных до обратноланцетных, снизу войлочнопущенные,

		цельнокрайние или, реже, с 1-3 крупными зубцами.	или с тонким опушением и с более длинными волосинками по жилкам	или с тонким опушением и с более длинными волосинками по жилкам	сверху - голые
9.	Тип жилкования	Сетчатое	Сетчатое	Сетчатое	Сетчатое
	Основание листовой пластинки	С выступающими жилками и выраженными ушками у основания	Закруглённым или более- менее клиновидным основанием	Клиновидное	Клиновидно суженные к основанию
10.	Особенности строения верхушки листа	Тупая, округлая или слегка выемчатая	Удлинённая тупая лопасть	Округлая, тупая лопасть	С заостренной или острой верхушкой
11.	Длина черешка, см	Короткий черешок длиной от 0,5 до 1,5 см	От 1,8 до 1,5 см	Длинные черешки длиной от 0,5 до 2 см	Тонкие, желобоватые, от 2 до 4 см, густоопушен ные
12.	Структура листа	Плотные, кожистые	Плотные, кожистые	Плотные, кожистые	Плотные, кожистые

Приложение 4. Фитохимическое исследование листьев перспективных видов рода *Quercus*

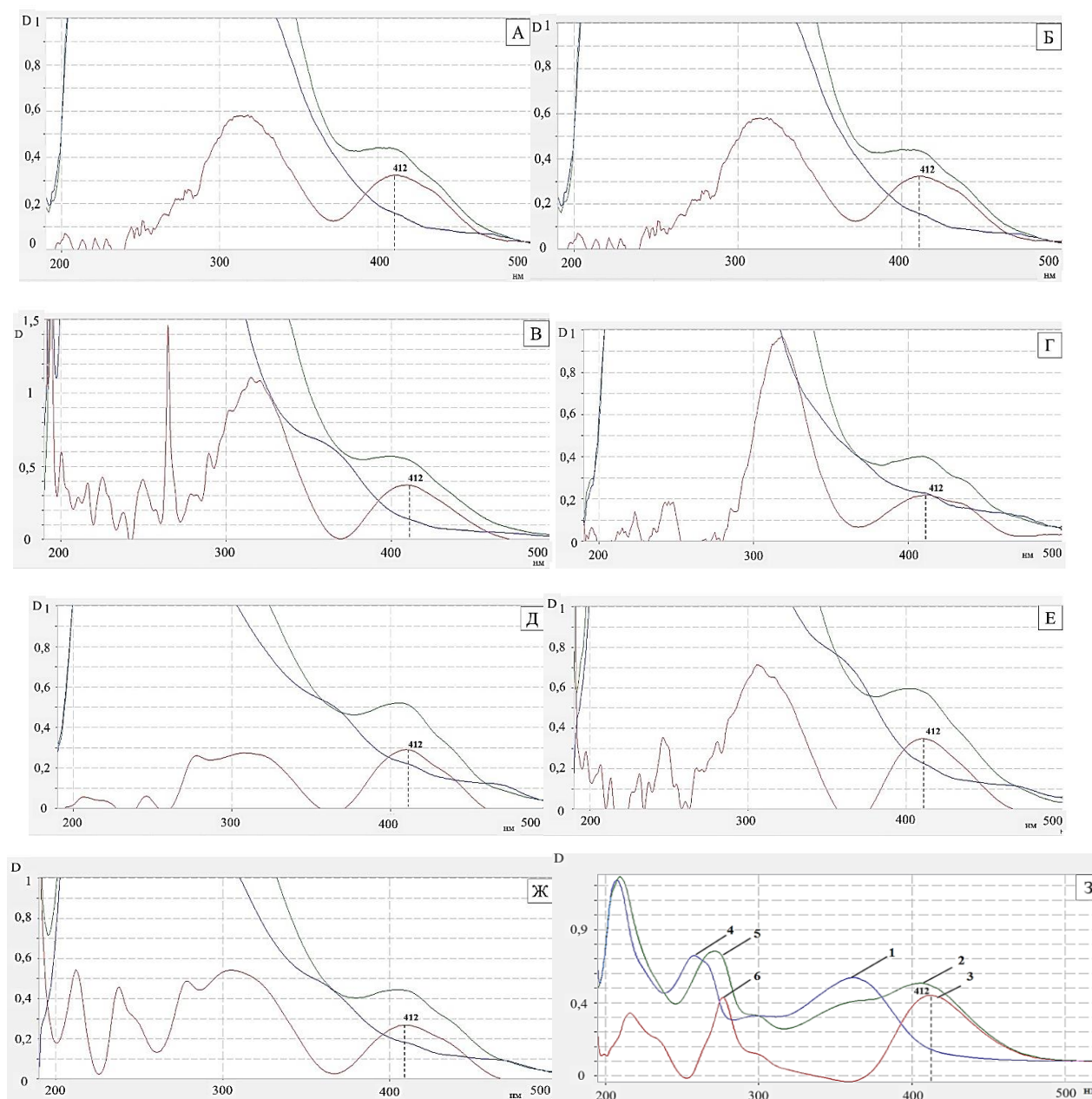


Рисунок 54 – Электронные спектры поглощения растворов водно-спиртовых извлечения из листьев дуба черешчатого на 70 % спирте этиловом: А – *Quercus robur* L.; Б – *Quercus pétraea* Liebl.; В – *Quercus rubra* L.; Г – *Quercus robur* var. *fastigiata* (Lam.) Spach.; Д – *Quercus mongolica* Fisch. ex Ledeb.; Е – *Quercus macrocarpa* Michaux; Ж – *Quercus Muehlenbergii* Engelmann; 3 - Спектральные кривые водно-спиртовых спиртовых растворов рутина. Обозначения: 1 – исходный раствор; 2 – раствор с добавлением алюминия хлорида; 3 – дифференциальная кривая; 1,2,3 и 4,5,6 – характерный для рутина батохромный сдвиг коротковолновой и длинноволновой полосы флавоноидов соответственно

Приложение 5. Изучение антимикробной активности водно-спиртовых извлечений и препаратов на основе коры, листьев и почек дуба черешчатого.

Таблица 25 – Результаты тестирования водно-спиртовых и хлороформных извлечений коры фармакопейной и многолетней *Q. robur* L.

Объект/ Микроорганизм	Кратность разведения*							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>								
Кора дуба 40 % (Образец № 1)	–	–	–	+	+	+	+	+
Кора дуба 60 % (Образец № 1)	–	–	–	–	–	+	+	+
Кора дуба 70 % (Образец № 1)	–	–	–	–	–	+	+	+
Кора дуба 96 % (Образец № 1)	–	–	–	–	–	+	+	+
Кора дуба 40 % (Образец № 2)	–	–	–	–	+	+	+	+
Кора дуба 60 % (Образец № 2)	–	–	–	–	–	+	+	+
Кора дуба 70 % (Образец № 2)	–	–	–	–	–	+	+	+
Кора дуба 96 % (Образец № 2)	–	–	–	–	–	–	+	+
Хлороформный экстр коры (Образец № 1)	–	–	–	–	+	+	+	+
Хлороформный экстр коры (Образец № 2)	–	–	–	–	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>								
Кора дуба 40 % (Образец № 1)	–	–	+	+	+	+	+	+
Кора дуба 60 % (Образец № 1)	–	–	–	–	+	+	+	+
Кора дуба 70 % (Образец № 1)	–	–	–	+	+	+	+	+
Кора дуба 96 % (Образец № 1)	–	–	–	–	+	+	+	+
Кора дуба 40 % (Образец № 2)	–	–	+	+	+	+	+	+
Кора дуба 60 % (Образец № 2)	–	–	–	–	+	+	+	+
Кора дуба 70 % (Образец № 2)	–	–	–	+	+	+	+	+
Кора дуба 96 % (Образец № 2)	–	–	–	–	+	+	+	+
Хлороформный экстр коры (Образец № 1)	–	–	–	+	+	+	+	+
Хлороформный экстр коры (Образец № 2)	–	–	–	–	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>								
Кора дуба 40 % (Образец № 1)	–	–	+	+	+	+	+	+
Кора дуба 60 % (Образец № 1)	–	–	–	–	+	+	+	+
Кора дуба 70 % (Образец № 1)	–	–	–	+	+	+	+	+
Кора дуба 96 % (Образец № 1)	–	–	–	–	+	+	+	+
Кора дуба 40 % (Образец № 2)	–	–	+	+	+	+	+	+
Кора дуба 60 % (Образец № 2)	–	–	–	–	+	+	+	+
Кора дуба 70 % (Образец № 2)	–	–	–	–	+	+	+	+
Кора дуба 96 % (Образец № 2)	–	–	–	–	–	+	+	+
Хлороформный экстр коры (Образец № 1)	–	–	–	+	+	+	+	+
Хлороформный экстр коры (Образец № 2)	–	–	–	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>								
Кора дуба 40 % (Образец № 1)	–	–	–	–	+	+	+	+
Кора дуба 60 % (Образец № 1)	–	–	–	–	–	+	+	+
Кора дуба 70 % (Образец № 1)	–	–	–	–	+	+	+	+

Кора дуба 96 % (Образец № 1)	–	–	–	–	–	+	+	+
Кора дуба 40 % (Образец № 2)	–	–	–	–	+	+	+	+
Кора дуба 60 % (Образец № 2)	–	–	–	–	–	+	+	+
Кора дуба 70 % (Образец № 2)	–	–	–	–	–	+	+	+
Кора дуба 96 % (Образец № 2)	–	–	–	–	–	+	+	+
Хлороформный экстр коры (Образец № 1)	–	–	–	–	–	+	+	+
Хлороформный экстр коры (Образец № 2)	–	–	–	–	–	+	+	+

* Примечание: + наличие роста микроорганизма; – отсутствие роста микроорганизма.

Таблица 26 – Минимальные подавляющие концентрации стандартных образцов экстрагентов («отрицательный» контроль).

Объект/ Микроорганизм	Кратность разведения*							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>								
Этиловый спирт 40 %	–	–	+	+	+	+	+	+
Этиловый спирт 60 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Этиловый спирт 70 %	–	–	+	+	+	+	+	+
Этиловый спирт 80 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Этиловый спирт 96 %	–	–	+	+	+	+	+	+
Димексид	–	+	+	+	+	+	+	+
Настойка эвкалипта 70%	–	–	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>								
Этиловый спирт 40 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Этиловый спирт 60 %	–	+	+	+	+	+	+	+
Этиловый спирт 70 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Этиловый спирт 80 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Этиловый спирт 96 %	–	–	+	+	+	+	+	+
Димексид	–	+	+	+	+	+	+	+
Настойка эвкалипта 70%	–	–	–	–	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>								
Этиловый спирт 40 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Этиловый спирт 60 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Этиловый спирт 70 %	–	–	–	–	+	+	+	+
Этиловый спирт 80 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Этиловый спирт 96 %	–	–	+	+	+	+	+	+
Димексид	–	+	+	+	+	+	+	+
Настойка эвкалипта 70%	–	–	–	–	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>								
Этиловый спирт 40 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Этиловый спирт 60 %	–	–	+	+	+	+	+	+
Этиловый спирт 70 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Этиловый спирт 80 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Этиловый спирт 96 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Димексид	–	+	+	+	+	+	+	+
Настойка эвкалипта 70%	–	–	+	+	+	+	+	+

* Примечание: + наличие роста микроорганизма; – отсутствие роста микроорганизма.

Таблица 27 – Результаты тестирования извлечений листьев и почек дуба черешчатого (*Q. robur* L.)

Объект/ Микроорганизм	Кратность разведения*							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>								
Листья дуба 40 %	–	–	+	+	+	+	+	+
Листья дуба 70 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Листья дуба 80 %	–	–	–	–	+	+	+	+
Листья дуба 96 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Почки дуба 40 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Почки дуба 70 %	–	–	–	–	+	+	+	+
Почки дуба 80 %	–	–	–	–	–	+	+	+
Почки дуба 96 %	–	–	–	–	–	+	+	+
Настойка листьев 70 %	–	–	–	–	+	+	+	+
Настойка почек 70 %	–	–	–	–	–	–	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>								
Листья дуба 40 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Листья дуба 70 %	–	–	–	–	–	+	+	+
Листья дуба 80 %	–	–	–	–	+	+	+	+
Листья дуба 96 %	–	–	–	–	+	+	+	+
Почки дуба 40 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Почки дуба 70 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Почки дуба 80 %	–	–	–	–	+	+	+	+
Почки дуба 96 %	–	–	–	–	+	+	+	+
Настойка листьев 70 %	–	–	–	–	+	+	+	+
Настойка почек 70 %	–	–	–	–	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>								
Листья дуба 40 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Листья дуба 70 %	–	–	+	+	+	+	+	+
Листья дуба 80 %	–	–	–	–	–	–	+	+
Листья дуба 96 %	–	–	–	–	–	+	+	+
Почки дуба 40 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Почки дуба 70 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Почки дуба 80 %	–	–	–	–	–	+	+	+
Почки дуба 96 %	–	–	–	–	+	+	+	+
Настойка листьев 70 %	–	–	–	–	–	+	+	+
Настойка почек 70 %	–	–	–	–	–	+	+	+
<i>Candida albicans</i>								
Листья дуба 40 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Листья дуба 70 %	–	–	–	+	+	+	+	+
Листья дуба 80 %	–	–	–	–	+	+	+	+
Листья дуба 96 %	–	–	–	–	+	+	+	+
Почки дуба 40 %	–	–	–	–	–	+	+	+
Почки дуба 70 %	–	–	–	–	–	+	+	+
Почки дуба 80 %	–	–	–	–	+	+	+	+
Почки дуба 96 %	–	–	–	–	–	+	+	+
Настойка листьев 70 %	–	–	–	–	–	–	+	+
Настойка почек 70 %	–	–	–	–	–	+	+	+

* Примечание: + наличие роста микроорганизма; – отсутствие роста микроорганизма.

**Приложение 6. Проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Дуба
черешчатого листа»**

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

УТВЕРЖДАЮ

Директор Центра фармакопей и международного
сотрудничества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств
медицинского применения», доктор фармацевтических
наук, профессор

_____ **Е.И. САКАНЯН**

«__» _____ 20__ г.

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ**

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Организация-разработчик: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Дуба черешчатого листа

ФС. 2.5.

Quercus robur folia

Вводится впервые

Срок введения установлен

с «__» _____ 20__ г.

до «__» _____ 20__ г.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

Собранные в конце мая или в начале-конце июня и высушенные листья дикорастущих и культивируемых деревьев дуба обыкновенного (черешчатого) – *Quercus robur* L. (syn.; *Q. pedunculata* Ehrh.) сем. буковых – *Fagaceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Сырье рассматривается невооруженным глазом, с помощью помощью лупы (х 10) или под стереоскопом (8 х, 16 х, 20 х, 40 х) в соответствии с разделом «Методы анализа лекарственного растительного сырья» (ГФ РФ XIV издания) ОФС. 1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Цельное сырье

Цельные или частично измельченные листья молодых ветвей – очередные, короткочерешковые, длиной 7-15 см, иногда до 20-30 см, шириной 4-7 см, удлинненно-

обратнойцевидные, при основании сердцевидные, сверху кожистые, блестящие голые, зеленые, снизу более бледные, с 4-6 (8) неодинакового размера цельно крайними тупыми лопастями, неодинаковыми по величине, цельно крайние или, реже, с 1-3 крупными зубцами, лопастей листа 4-6, реже 8 пар.

Черешок листа – небольшой, короткий (0,5-1 см длиной), опушен простыми одноклеточными волосками; по бортам черешка в апикальной части присутствуют выступы. Основание черешка, его базальная часть, в сравнении с апикальной частью значительно расширено. Размеры поперечных сечений черешка в самой длинной части, через центр черешка составили: базальная часть черешка – от 2,6 мм до 2,8 мм, медиальная – от 2,1 мм до 2,3 мм, апикальная – от 1,4 мм до 1,6 мм.

Измельченное сырье

Кусочки листьев различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Цвет кусочков листьев от светло-зеленого до темно-зеленого. Запах обнаруживается при растирании, нехарактерный. Вкус водного извлечения вяжущий, терпкий.

Микроскопические признаки.

Сырье исследуется при помощи микроскопа (40×, 100×, 400×) в соответствии с разделом ОФС. 1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» (ГФ РФ XIV издания).

Цельное сырье

При анализе микропрепаратов видно, что эпидермис верхней стороны листа состоит из разноразмерных клеток неправильной, многоугольной формы. Над жилками эпидермис верхней стороны представлен вытянутыми клетками. Эпидермис нижней стороны листа состоит из разных по размеру клеток неправильной угловатой формы, на котором хорошо различимы устьица аномоцитного типа. Эпидермис и жилка нижней стороны листовой пластинки опушены одиночными простыми одноклеточными волосками и ветвистыми волосками, напоминающими пучки по 2-, 4-х лучевых волоска, с гладкой поверхностью, длина волосков составляет в среднем до 100 мкм. Расположены волоски по всей поверхности листовой пластинки, преимущественно ближе к жилкам. На нижней стороне листа также присутствуют головчатые железистые волоски. По краю листовой пластинки отмечается уменьшение размера клеток эпидермиса, как с нижней так и с верхней стороны. Клеточные стенки при этом утолщаются относительно основной эпидермы листа. Непосредственно по краю виден выраженный слой кутикулы. Край листовой пластинки ровный, без выступов, с верхней стороны не опушен. По нижнему краю листовой пластинки присутствуют устьица аномоцитного типа и волоски, описанные ранее для нижней стороны листа. При исследовании поперечных сечений листовой пластинки выявлено, что анатомически пластинка дорзовентральная. Хорошо различимы столбчатый и губчатый мезофилл. Центральная жилка листовой пластинки на поперечном сечении округлой формы. С верхней и нижней стороны незначительно армирована слабо выраженной угловой колленхимой (рис. 1). Основной объем жилки занимает проводящие ткани, представленные двумя плотно сомкнутыми пучками коллатерального типа.

При проведении гистохимических реакций микропрепаратов поперечных срезов медиальной части листовых пластинок были получены следующие результаты. После обработки микропрепарата серноокислым анилином отмечается ярко-желтое окрашивание коллемных тканей проводящей системы и тканей склеренхимы. После обработки микропрепарата 5 % раствором Судана III, отмечается окрашивание кутикулы и механического пояса в оранжево-красный слой. После обработки раствором Люголя в центре поперечного среза наблюдается

темно-синее окрашивание содержимого клеток, что говорит о наличии крахмальных зерен в клетках данного объекта (рис. 1). На протяжении всей жилки листовой пластинки встречаются друзы оксалата неправильной формы. Флоэма обоих пучков пигментирована за счет аморфных протопластов клеток в тёмно-бурый цвет. Ксилема пучков, занимающая больший объём относительно флоэмы, пигментирована слабо. По периферии пучков со стороны флоэмы локализовано тонкое кольцо склеренхимных волокон. Также достаточно хорошо различим механический пояс – склеренхима, отмечается выраженность колленхимных клеток в адаксиальной части (рис. 1).

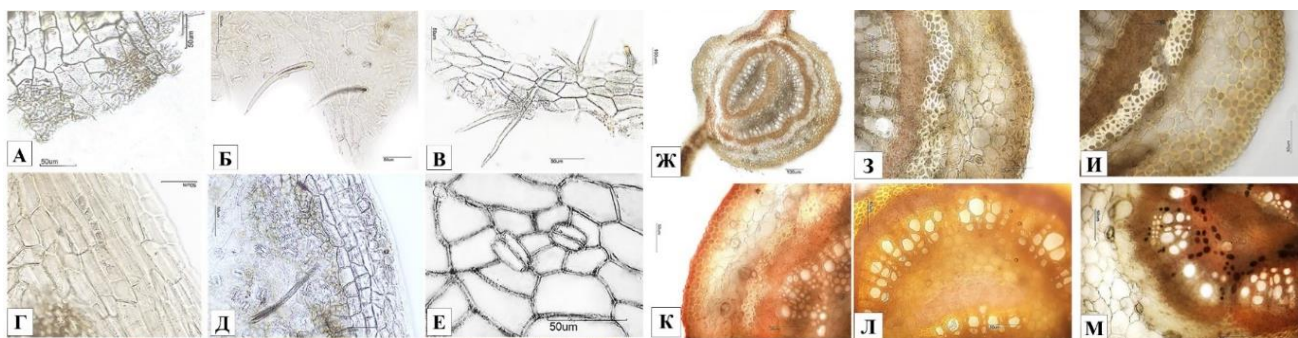


Рисунок 1 – Дуба черешчатого листа. Обозначения: А – эпидермис верхней стороны листа ($\times 400$); Б – эпидермис нижней стороны листа ($\times 100$); В – эпидермис жилки нижней стороны ($\times 400$); Г – край верхней стороны; Д – край нижней стороны ($\times 400$); Е – устьица нижней стороны листа ($\times 400$); Ж – фрагмент центральной жилки ($\times 100$); З – склеренхима пучка с адаксиальной стороны ($\times 400$); И – склеренхима пучка с абаксиальной стороны ($\times 400$); К – фрагмент поперечного сечения после окраски 0,5 % раствором Судана III ($\times 400$); Л – фрагмент поперечного сечения после окраски 10%-ным раствором сернокислого анилина ($\times 400$); М – окраска раствором Люголя, поперечный срез ($\times 400$).

Очертания базальной, медиальной и апикальной частей поперечных срезов черешка различается, округлое и отличаются наличием (базальная часть) или отсутствием (медиальная и апикальная части) выемки с адаксиальной стороны черешка (рис. 2).

На продольном срезе заметно, что эпидермис черешков опушен простыми одиночными одноклеточными волосками и ветвистыми волосками по 2 лучевых волоска с гладкой поверхностью, длина волосков составляет в среднем до 100,5 мкм. Расположены волоски по всей поверхности черешка, преимущественно ближе к апикальной части, к основанию листовой пластинки. Клетки эпидермиса черешков на поперечных срезах представлены вытянутой прямоугольной формой. Клеточные стенки, примыкающие к паренхиме, тонкие целлюлозные. С наружной и радиальных сторон они значительно утолщены. С поверхности эпидермис кутинизирован, что подтверждено изменением окраски на красно-оранжевую после обработки раствором Судана III (рис. 2).

В базальной и медиальной частях основная паренхима черешка заметно развита, в апикальной выражена слабо (рис. 2).

Обработка микропрепаратов раствором Судан III в зонах основной паренхимы черешка и сердцевины позволила выявить липофильные структуры протопластов основных тканей, которые окрашиваются в красно-розовый цвет. При окрашивании микропрепарата раствором сернокислого анилина отмечается изменение цвета клеток механической ткани на ярко-желтый цвет (рис. 2).

Паренхима представлена разноразмерными клетками с нативно бурым протопластом. В паренхиме часто встречаются друзы звездчатой формы с диаметром от 13,8 мкм до 37,5 мкм.

Особенно много их наблюдается на поперечных срезах в медиальной части черешка. Также друзы присутствуют и на продольных срезах эпидермиса. В склеренхимных волокнах присутствуют монокристаллы обкладки неправильной формы (рис. 2).

Склеренхимные волокна на поперечном сечении разноразмерные, неправильной более-менее овальной формы. Лигнификация склеренхимы подтверждается окраской раствором сернокислого анилина. В склеренхиме отмечается незначительная кристаллоносная обкладка из монокристаллов неправильной формы. По бортам черешка, ближе к адаксиальной стороне, имеются ребра. Они наиболее выражены в апикальной части поперечного среза. Ребра на поперечном сечении имеют вид треугольных выступов, которые переходят в расширяющуюся листовую пластинку (рис. 2).

В области ребер локализован блок колленхимы. Полости клеток колленхимы на поперечном сечении округло-овальные. В их протопласте диагностируются мелкие друзы оксалата кальция. Неравномерно утолщенные клеточные стенки целлюлозные без выраженных пор. Необходимо отметить, что развитость блока колленхимы в ребрах неоднородная. Число рядов колленхимных клеток и степень утолщенности их стенок заметно снижается ближе к апикальной части. Число рядов колленхимных клеток варьирует от четырех до шести (рис. 2).

Элементы проводящей части черешка расположены кольцом в центре поперечного среза. В зависимости от места среза, картина проводящей части черешка различается (рис. 2).

В базальной части проводящие ткани, расположенные по кольцу, собраны в закрытые коллатеральные пучки, разделенные лучами основных тканей. В медиальной части пучки разделены между собой незначительно и загнуты во внутрь, к центру симметрии поперечного среза черешка, с адаксиальной стороны. В апикальной части поперечного среза кольцо проводящих тканей непрерывное (рис. 2).

В клетках флоэмы заметны многочисленные мелкие друзы, размерностью. Ксилема проводящей части черешка на поперечном сечении сложена из радиально расположенных сосудов, диаметр их, как правило, увеличивается от сердцевины черешка к флоэме. Сосуды армированы волокнами либриформа. Сердцевинные лучи сложены из живых клеток с бурым протопластом. Их целлюлозные клеточные стенки заметно утолщены и не реагируют на реактивы (рис. 2).

По периферии проводящая часть черешка армирована блоком склеренхимных волокон. В зависимости от степени срастания пучков склеренхима локализована блоками (в базальной части), относительно отдельных пучков либо непрерывным кольцом в апикальной части, повторяя очертания проводящей части черешка (рис. 2).

Измельченное сырье

При анализе микропрепаратов листовой пластинки отмечаются следующие фрагменты сырья: клетки эпидермиса неправильной многоугольной формы; устьица аномоцитного типа; одноклеточные и многоклеточные волоски или их части; железистые голбочатые волоски с гладкой поверхностью. Также могут встречаться отдельно черешки или его части.

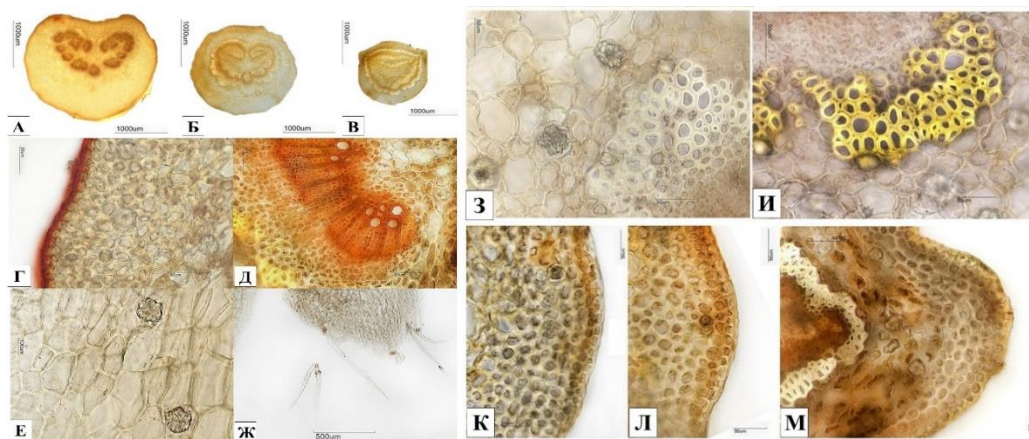


Рисунок 2 – Петиолярные признаки листьев дуба черешчатого. Обозначения: А, Б, В – поперечный срез базальной (А), медиальной части (Б) и апикальной (В) части черешка соответственно (x40); Г – фрагмент поперечного сечения эпидермиса после окраски 0,5 % раствором Судана III (x400); Д – фрагмент поперечного сечения проводящей системы после окраски 0,5 % раствором Судана III (x400); Е – кристаллические включения паренхимы поперечного среза (x400); Ж – фрагмент эпидермиса черешка, опушенного одноклеточными волосками (x100); И – склеренхима и кристаллические включения поперечного среза черешка (x400); К – склеренхима, после окраски 10% раствором сернокислого анилина (x400); К, Л, М – фрагменты ребер в базальной, медиальной и апикальной части поперечного среза черешка соответственно (x400).

Определение основных групп биологически активных веществ:

1. Качественные реакции

К 1 мл полученного извлечения, приготовленного как указано в разделе «Количественное определение», прибавляют 2 мл 3 % раствора алюминия (III) хлорида спиртового, через 20-30 минут появляется зеленовато-желтое окрашивание.

2. Тонкослойная хроматография

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,005 г СО рутина растворяют в 10 мл спирта 70 % и перемешивают. Срок годности раствора 1 месяц при хранении в прохладном, защищенном месте.

Хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» или «Сорбфил-ПТСХ-ПА-УФ» предварительно активируют в сушильном шкафу при температуре 100-105 °С (60 мин). На линию старта пластинки микропипеткой наносят 0,02 мл водно-спиртового извлечения, полученного в разделе «Количественное определение». В качестве вещества-свидетеля используют спиртовые растворы СО рутина, кверцитрина и астрагалина. Пластинку помещают в хроматографическую камеру, насыщенную парами смеси растворителей хлороформ – спирт этиловый – вода очищенная в соотношении 25:18:2. Хроматографируют восходящим способом.

После того, как фронт растворителя проходит около 8 см, пластинку достают из камеры, высушивают и просматривают в УФ-свете при длине волны 366 нм. При этом на хроматограмме обнаруживается зелено-бурое пятно (366 нм) с величиной R_f около 0,8 и 0,66 (кверцитрин и астрагалин соответственно), а также темно-синее (366 нм) с величиной R_f около 0,54 (СО рутина). Затем хроматограмму проявляют 3 % спиртовым раствором алюминия хлорида, высушивают. Пятно рутина приобретает яркую желто-зеленую флуоресценцию. После этого хроматограмму проявляют щелочным раствором диазобензолсульфокислоты, высушивают. Пятна приобретают желто-оранжевое окрашивание. Допускается обнаружение других окрашенных зон.

3. УФ-спектроскопия

При анализе извлечения методом прямой спектрофотометрии наблюдаются невыраженные максимумы поглощения при 365 ± 2 нм и 406 ± 2 нм. При анализе электронных спектров методом дифференциальной спектрофотометрии наблюдаются два выраженных максимума при 318 ± 2 нм и 406 ± 2 нм (рис. 3).

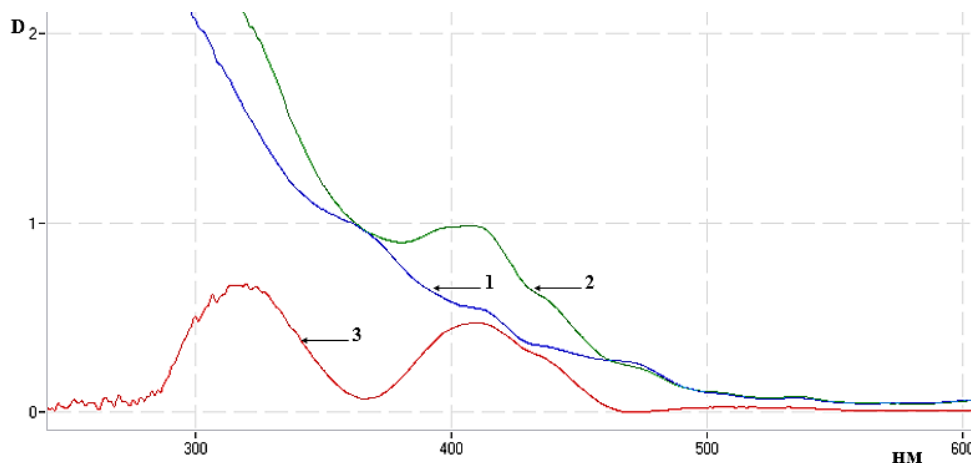


Рисунок 3 – Спектральный профиль водно-спиртового извлечения из листьев *Quercus robur* L.
Обозначения: 1 – спектр извлечения; 2 – электронный спектр извлечения + $AlCl_3$; 3 – дифференциальный электронный спектр извлечения

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. Цельное сырье, измельченное сырье – не более 8 %.

Зола общая. Цельное сырье, измельченное сырье, порошок – не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. Цельное сырье, измельченное сырье, порошок – не более 3 %.

Измельченность сырья. Цельное сырье: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, не более 5 %. Измельченное сырье: проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм не более 5 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями, размером 0,5 мм не более 5 %.

Посторонние примеси.

Стеблей. Цельное, измельченное сырье: не более 50 %.

Органическая примесь. Цельное, измельченное сырье: не более 1 %.

Минеральная примесь. Цельное, измельченное сырье: не более 1 %.

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС 1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС 1.5.3.0001.15 «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС 1.5.33.0011.15 «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Микробиологическая чистота. В соответствии с ОФС 1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» (ГФ РФ XIV издания).

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:* дубильных веществ – не менее 2,0 %, суммы флавоноидов в пересчете на рутин не менее 0,30 %, экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 % не менее 35,0 %.

Определение 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 стандартного образца – 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 А – 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.

В случае отсутствия стандартного образца рутина целесообразно использовать теоретическое значение удельного показателя поглощения – 240.

$$X = \frac{A \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{m \cdot 240 \cdot 2 \cdot (100 - W)}$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, г;

240 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) СО рутина при 412 нм;

W – потеря в массе при высушивании в процентах.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС 1.5.3.0006.15 «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах (метод 1, экстрагент – спирт 70 %). В листьях дуба черешчатого – не менее 35 %.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС 1.1.0025.18 «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» (ГФ РФ XIV издания).

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» (ГФ РФ XIV издания).

Проректор
по научной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук,
профессор



И.Л. Давыдкин
_____ 2021

Заведующий кафедрой
фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России,
доктор фармацевтических наук,
профессор

В.А. Куркин
_____ 2021

Доцент кафедры
фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России,
кандидат фармацевтических наук,
доцент

В.М. Рыжов
_____ 2021

Очный аспирант кафедры
фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России

Н.А. Рябов
_____ 2021

Приложение 7. Проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Дуба черешчатого почки»

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

УТВЕРЖДАЮ

Директор Центра фармакопеи и международного сотрудничества ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения», доктор фармацевтических наук, профессор

Е.И. САКАНЯН

«__» _____ 20__ г.

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ**

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Организация-разработчик: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Дуба черешчатого почки

ФС. 2.5.

Вводится впервые

Quercus robur gemmae

Срок введения установлен

с «__» _____ 20__ г.

до «__» _____ 20__ г.

Собранные ранней весной и высушенные почки дикорастущих и культивируемых деревьев дуба обыкновенного (черешчатого) – *Quercus robur* L. (syn.; *Q. pedunculata* Ehrh.) сем. буковых – *Fagaceae*.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Сырье рассматривается невооруженным глазом, с помощью помощью лупы (х10) или под стереоскопом (8 х, 16 х, 20 х) в соответствии с разделом «Методы анализа лекарственного растительного сырья» (ГФ РФ XIV издания), ОФС. 1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Цельное сырье

Цельные или частично измельченные боковые и/или верхушечные (апикальные) почки молодых ветвей от 1 до 5-ти летнего возраста. Форма апикальных почек овальная, на верхушке – конусовидная, в длину почки достигают 6 мм, в ширину – до 4 мм. Цвет почек однородный, светло-коричневый или бурый, с жесткими кожистыми кроющими чешуями, расположенными черепитчато, визуально голые, не опушены и не имеют смолистых выделений. Запах почек вязущий, сладковатый специфический.

Микроскопические признаки.

Цельное сырье.

Почки дуба в сложении плотно-сомкнутые, на поперечном сечении округлой (яйцевидной) формы с незначительными ребрами.

На верхней стороне эпидермиса кроющих чешуй присутствуют железистые трихомы и простые кроющие волоски, люминесцирующие зеленым светом при облучении микропрепарата светом с $\lambda = 420$ нм и голубым светом при облучении микропрепарата светом с $\lambda = 360$ нм. Пучки проводящей системы базальной и стеблевой частей светятся ярко зеленым светом при облучении микропрепарата светом с $\lambda = 420$ нм и ярко-голубым светом при облучении микропрепарата светом с $\lambda = 360$ нм (рис. 1).

Фрагменты соцветий медиальной части почек дуба, расположенных по окружности зачатков цветков на поперечных срезах при облучении микропрепарата светом с $\lambda = 420$ нм в увеличении $\times 100$ наблюдается характерное зеленовато-желтое свечение, при облучении микропрепарата светом с $\lambda = 360$ нм, в увеличении $\times 100$, видно ярко выраженное свечение голубого цвета по периферии среза (рис. 1).

Поперечные сечения кроющих чешуй при увеличении ($\times 400$) сложены из мезофилла, содержащего склеренхимные волокна округлой формы; с мелкими проводящими пучками, окрашенных в бурый цвет. Внутренний эпидермис кроющих чешуй сложен из округлых по форме клеток с сильно пигментированным бурым протопластом. На апикальном срезе видны фрагменты примордиев (зачатков листочков) с V-образным листосложением. Эпидермальные клетки с поверхности кроющих чешуй вытянутые, угловатые. Клетки с внутренней стороны (верхний эпидермис) значительно длиннее, чем с наружной (нижний эпидермис). На верхнем эпидермисе присутствуют железистые трихомы – железки. Они имеют одноклеточную ножку с бурым протопластом. Головка железки также одноклеточная, внутри клетки головки локализован слабо окрашенный протопласт (рис. 1).

При рассмотрении на большом увеличении в 400 раз видно, что на протяжении всего продольного среза почек дуба у основания кроющих чешуй присутствует обкладка из нескольких слоев клеток, люминесцирующих ярко-желтым светом при облучении микропрепарата при $\lambda = 420$ нм и ярко-голубым светом при $\lambda = 360$ нм. Подобной люминесценцией обладают клетки паренхимы всего продольного среза. Края кроющих чешуй опушены плотным слоем простых одноклеточных тонкостенных волосков (рис. 1).

Проводящие элементы ксилемы и флоэмы базальной части почек расположены непрерывно по окружности осевой части в виде пятиугольника, при этом сосуды ксилемы светятся желто-зеленым светом при $\lambda = 420$ нм и ярко-голубым светом при $\lambda = 360$ нм (рис. 1).

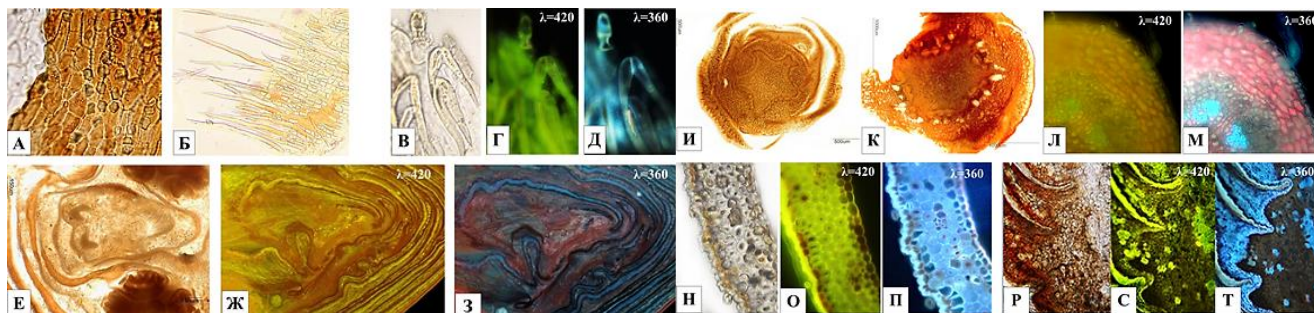


Рисунок 1 – Дуба черешчатого почки. Обозначения: А – эпидермис нижней стороны кроющих чешуй (x400); Б – эпидермис верхней стороны кроющих чешуй (x400); В – трихомы верхнего эпидермиса (x400); Г – облучение трихом при $\lambda=420$ нм; Д – облучение трихом при $\lambda=360$ нм; Е – фрагмент почки с примордиями на поперечном сечении (x400); Ж – облучение при $\lambda=420$ нм; З – облучение при $\lambda=360$ нм; И – поперечное сечение базальной части почки (x100); К – стеблевая часть почки на поперечном сечении (x100); Л – фрагменты проводящей системы при облучении при $\lambda=420$ нм; М – фрагменты проводящей системы облучении при $\lambda=360$ нм (x100); Н – фрагмент кроющей чешуи (x400); О – фрагмент внутренней чешуи (x400); П – облучение при $\lambda=420$ нм; Р – основание кроющих чешуй (x400); С – облучение при $\lambda=420$ нм; Т – облучение при $\lambda=360$ нм.

Измельченное сырье

При анализе микропрепаратов почек дуба отмечаются следующие фрагменты сырья: клетки эпидермиса многоугольной формы; одноклеточные волоски или их части; железистые трихомы или их части. Также могут встречаться отдельно части кроющих чешуй с соответствующими признаками.

Определение основных групп биологически активных веществ:

1. Качественные реакции

К 1 мл полученного извлечения, приготовленного как указано в разделе «Количественное определение», прибавляют 2 мл 3 % раствора алюминия (III) хлорида спиртового, через 20-30 минут появляется зеленовато-желтое окрашивание.

2. Тонкослойная хроматография

Используют раствор стандартного образца (СО) цинарозида как указано в разделе «Количественное определение».

Хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» или «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ» предварительно активируют в сушильном шкафу при температуре 100-105 °С (60 мин). На линию старта пластинки микропипеткой наносят 0,02 мл водно-спиртового извлечения, полученного в разделе «Количественное определение». В качестве вещества-свидетеля используют спиртовые растворы СО цинарозида. Пластинку помещают в хроматографическую камеру, насыщенную парами смеси растворителей хлороформ – спирт этиловый – вода очищенная в соотношении (25:18:2). Хроматографируют восходящим способом.

После того, как фронт растворителя проходит около 8 см, пластинку достают из камеры, высушивают и просматривают в УФ-свете при длине волны 366 нм. При этом в хроматографическом профиле водно-спиртового извлечения из почек дуба обнаруживается зелено-бурое пятно (366 нм) с величиной $R_f=0,64$, которое по хроматографическим характеристикам совпадает с пятном СО цинарозида. Затем хроматограмму проявляют 3 % спиртовым раствором алюминия хлорида, высушивают. Пятна, соответствующие СО цинарозид, в хроматографическом профиле водно-спиртового извлечения из почек дуба и раствора

сравнения приобретают яркую желто-зеленую флуоресценцию. После этого хроматограмму проявляют щелочным раствором диазобензолсульфокислоты, высушивают.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 9 %.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 10 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок* – не более 2 %.

Измельченность сырья. *Цельное сырье:* частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, не более 5 %. *Измельченное сырье:* проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм не более 8 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями, размером 0,5 мм не более 4 %.

Посторонние примеси.

Стебли. *Цельное, измельченное сырье:* не более 5 %.

Распустившиеся почки. *Цельное сырье:* не более 3 %.

Органическая примесь. *Цельное, измельченное сырье:* не более 1 %.

Минеральная примесь. *Цельное, измельченное сырье:* не более 1 %.

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС 1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС 1.5.3.0001.15 «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС 1.5.33.0011.15 «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Микробиологическая чистота. В соответствии с ОФС 1.2.4.0002.18 «Микробиологическая чистота» (ГФ РФ XIV издания).

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье:* содержание суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид не менее 0,25 %, экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70 % не менее 21 %.

Методика определения суммы флавоноидов в пересчете на СО цинарозид.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в коническую термостойкую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл спирта этилового 70 %. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на аналитических весах с точностью до $\pm 0,001$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 120 мин. Затем колбу охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы колбы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (красная полоса).

Приготовление испытуемого раствора

5 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), перемешивают и оставляют на некоторое время (40 минут) для образования комплекса флавоноидов с алюминием. Затем измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 400 нм. В качестве раствора сравнения используют раствор, полученный следующим образом: 5 мл

извлечения (1:50) помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят объем раствора спиртом этиловым 96 % до метки.

Приготовление раствора стандартного образца цинарозида

Около 0,01 г (точная навеска) цинарозида помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл спирта этилового 70 % при нагревании на водяной бане. Использование спирта этилового 70 % позволяет обеспечить наилучшее растворение СО цинарозида. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры, его объем доводят спиртом этиловым 70 % до метки (раствор А цинарозида). 2 мл раствора А цинарозида 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 цинарозида). Измеряют оптическую плотность раствора Б на спектрофотометре при длине волны 400 нм.

Приготовление раствора сравнения

2 мл раствора А цинарозида помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (раствор сравнения Б цинарозида). Поскольку при доведении до метки отобранной аликвоты водно-спиртового извлечения почек дуба использовался спирт этиловый 96 %, то при доведении до метки раствора А цинарозида также использовался спирт данной концентрации.

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

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 5 \cdot 25 \cdot 25 \cdot (100 - W)},$$

где: D – оптическая плотность испытуемого раствора; D_0 – оптическая плотность раствора СО цинарозида; m – масса сырья, г; m_0 – масса СО цинарозида, г; W – потеря в массе при высушивании в процентах.

В случае отсутствия стандартного образца цинарозида целесообразно использовать теоретическое значение удельного показателя поглощения – 334.

$$X = \frac{D \cdot 50 \cdot 25 \cdot 100}{m \cdot 334 \cdot 5 \cdot (100 - W)},$$

где: D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса сырья, г; 334 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) СО цинарозида при 400 нм; W – потеря в массе при высушивании в процентах.

Значение удельного показателя поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) для СО цинарозида при 400 нм рассчитывалось экспериментально по формуле:

$$E_{1\text{см}}^{1\%} = \frac{D \cdot V_1 \cdot V_2}{100 \cdot q \cdot m_0},$$

где: D – оптическая плотность испытуемого раствора; m_0 – масса СО цинарозида, г; V_1 – Объем колбы 1, мл; V_2 – Объем колбы 2, мл; q – Объем аликвоты, мл.

Экстрактивные вещества. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания экстрактивных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах (метод 1, экстрагент – спирт 70 %).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС 1.1.0025.18 «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» (ГФ РФ XIV издания).

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» (ГФ РФ XIV издания).

Проректор
по научной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук,
профессор



И.Л. Давыдкин
2021

Заведующий кафедрой
фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России,
доктор фармацевтических наук,
профессор

«23» 12

В.А. Куркин
2021

Доцент кафедры
фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России,
кандидат фармацевтических наук,
доцент

«23» 12

В.М. Рыжов
2021

Очный аспирант кафедры
фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России

«23» 12

Н.А. Рябов
2021