

РЯЗАНОВА ТАТЬЯНА КОНСТАНТИНОВНА

**ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ И ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ
ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННОГО
РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ
ПРЕПАРАТОВ, СОДЕРЖАЩИХ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ
ВЕЩЕСТВА АРОМАТИЧЕСКОЙ И ТЕРПЕНОИДНОЙ ПРИРОДЫ**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук**

Самара 2022

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

Научный консультант:

доктор фармацевтических наук, профессор

Куркин Владимир Александрович

Официальные оппоненты:

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

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

Марахова Анна Игоревна, доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное автономное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов, институт биохимической технологии и нанотехнологии, профессор.

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

Защита диссертации состоится «__» _____ 2022 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. Карла Маркса, 165Б).

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

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат фармацевтических наук,

доцент

Жданова Алина Валитовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы.

Лекарственные средства (ЛС) растительного происхождения, содержащие биологически активные вещества (БАС) ароматической и терпеноидной природы, составляют значительную часть объемов продаж на мировом фармацевтическом рынке и фармацевтическом рынке Российской Федерации (РФ). Количество лекарственных препаратов (ЛП) растительного происхождения на фармацевтическом рынке РФ составляет около 4000 наименований (Киселева Т.Л. и др., 2008; Киселева Т.Л. и др., 2013; Самылина И.А. и др., 2016;). По данным Всемирной организации здравоохранения, использование фитопрепаратов показывает тенденцию к росту, их доля в общем объеме потребления может достигнуть 60% (Самылина И.А. и др., 2016; Heinrich M. et al., 2018). В последние годы активно развивается фитобиотехнологическое направление в медицине, направленное на получение востребованных высокоактивных БАС высших растений с использованием клеточных культур, бактерий, дрожжевых клеток (Белоногова В.Д. и др., 2006; Загоскина Н.В. и др., 2019; Badal S. et al., 2016; Kar A., 2003).

Лекарственные растения содержат различные соединения, являющиеся первичными или вторичными метаболитами, которые могут оказывать различное воздействие на организм человека: противоопухолевое, антиоксидантное, противовоспалительное, противомикробное, противодиабетическое, противоостеопоротическое, нейропротективное, обезболивающее и т.д., при этом наиболее распространенные БАС относятся к веществам ароматической и терпеноидной природы (Загоскина Н.В. и др., 2019, Киселева Т.Л. и др., 2007; Dillard S., 2000; Evans W. S., 2014). По своему механизму действия соединения растительного происхождения могут выступать в качестве субстратов биохимических реакций, кофакторов и ингибиторов ферментативных реакций, лигандов, которые способствуют или препятствуют связыванию с рецепторами, веществ, усиливающих абсорбцию и/или стабильность основных питательных веществ, и др. Входящий в состав лекарственных растительных препаратов (ЛРП) БАС могут усиливать действие друг друга (Куркин В.А., 2020; Самылина И.А. и др., 2016; Evans, W. S.; 2014; Heinrich M. et al., 2018).

На текущий момент тот факт, что не изучены химический состав и фармакологическая активность около 80% всех видов растений, а также разнообразие химической структуры БАС растительного происхождения открывают широкие перспективы для разработки новых эффективных ЛП с благоприятным профилем безопасности (Куркин В.А., 2020, Загоскина Н.В. и др., 2019).

В то же время одними из проблем при разработке лекарственных средств растительного происхождения является правильная идентификация ЛРС в процессе заготовки и при приемке на фармацевтических предприятиях. Решение этой проблемы заключается в комбинации физических, физико-химических, химических

и биологических методов анализа (морфолого-анатомические исследования, ультрафиолетовая спектрофотометрия [УФ-спектрофотометрия], тонкослойная хроматография [ТСХ], высокоэффективная жидкостная хроматография [ВЭЖХ], газовая хроматография [ГХ], инфракрасная спектрометрия [ИК-спектрометрия], генетические исследования и т.д.) (Бубенчикова В.Н. и др., 2022; Самылина И.А. и др., 2016). При этом проблемными моментами являются выбор анализируемого вещества (индивидуальное вещество, группа БАС), выбор метода анализа и вещества, в пересчете на которое рассчитывается содержание БАС.

Сравнение методов, используемых для анализа ЛРС и ЛРП на его основе, также показывает, что актуальной проблемой остается неабсолютное применение системного подхода к стандартизации ЛС растительного происхождения в ряду «сырье-фармацевтическая субстанция-препарат» (Саканян Е.И. и др., 2018; Сокольская Т.А. и др., 2011; Шемерянкина Т.Б. и др., 2014). Для этих целей необходимо обеспечить гармонизацию методик идентификации и количественного определения БАС в ЛРС и ЛРП (Бубенчикова В.Н. и др., 2022; Самылина И.А. и др., 2012; Harborne J., 2008; Heinrich M. et al., 2018).

Одним из примеров необходимости актуализации требований к стандартизации являются несовершенства методик качественного и количественного анализа ЛРС, содержащего различные группы БАС: фенилпропаноиды (корневища с корнями элеутерококка колючего, кора сирени обыкновенной, корневища с корнями родиолы розовой), флавоноиды (цветки бессмертника песчаного), сапонины (корни аралии маньчжурской, корни солодки), антраценпроизводные (листья алоэ древовидного) и др. (Куркин В.А. и Авдеева Е.В., 2009; Куркин В.А. и др., 2015; Куркин В.А. и др., 2016; Оленников Д.Н. и др., 2010).

Использование инструментальных методов анализа предполагает наличие стандартных образцов (СО), в связи с чем возникают вопросы по созданию национальных фармакопейных СО для оценки качества ЛРС и ЛРП, разработке базы нормативных документов по качеству СО. В Российской Федерации проблемы обеспечения стандартными образцами ЛС включают недостаточное производство национальных фармакопейных СО, длительность поставки, высокая стоимость зарубежных фармакопейных СО (Европейская, Британская фармакопеи, Фармакопея США) (Волкова Р.А. и др., 2020; Воронин А. В. и др., 2020; Леонтьев Д.А. и др., 2016). В утвержденной распоряжением Правительства Российской Федерации от 19 апреля 2017 г. № 737-р Стратегии обеспечения единства измерений Российской Федерации до 2025 г. также уделяется особое внимание вопросам развития деятельности в области СО, значительная роль отводится проблемам создания необходимой номенклатуры СО. Не менее важной задачей в Стратегии обозначена необходимость «совершенствования и гармонизации с международными требованиями в области стандартных образцов отечественной нормативной правовой базы, способствующей созданию и применению стандартных образцов, соответствующих современным требованиям».

В связи с этим актуальными являются вопросы создания единой концепции, охватывающей принципы выбора метода анализа и системного подхода к анализу ЛРС и ЛРП, разработки технологии получения национальных фармакопейных СО для оценки качества ЛРС и ЛРП, подготовки нормативной документации по качеству ЛРС, ЛРП с учетом современных данных о химическом составе, методологических подходов к анализу изучаемых растений и продуктов их переработки и с соблюдением принципов системного подхода и нормативных документов по качеству фармакопейных СО.

Степень разработанности проблемы.

Проводятся исследования по обоснованию подходов к разработке методик количественного анализа БАС в ЛРС и ЛРП с учетом принципа «сквозной» стандартизации (Марахова А.И., 2017; Шмыгарева А.А., 2017). Однако в российских и зарубежных работах не представлен методологический алгоритм и принципиальные подходы к разработке методик анализа ЛРС и ЛРП. В работах А.И. Мараховой предложены алгоритм разработки методики количественного анализа БАС в ЛРС и препаратах с учетом влияния состава метаболома растения и принципов «сквозной» стандартизации и алгоритм проведения спектрофотометрического определения суммы флавоноидов в ЛРС. Однако, актуальной проблемой остается алгоритмизация подходов к выбору метода анализа различных групп БАС, из которых подавляющее большинство имеет ароматическую и терпеноидную природу, и формулирование принципов «сквозной» стандартизации ЛРС и ЛРП на его основе.

Сравнение подходов к оценке качества ЛРС и ЛРП в Российской Федерации и Европейском Союзе демонстрирует, что преобладающим методом для оценки их подлинности является ТСХ, а для количественного определения действующих компонентов в основном используются инструментальные методы анализа (спектрофотометрия, ВЭЖХ, газовая хроматография). В Европейской Фармакопее метод ВЭЖХ применяется чаще по сравнению с Государственной Фармакопеей РФ XIV издания. Метод ВЭЖХ имеет ряд преимуществ при анализе ЛРП по сравнению с другими методами благодаря более высокой селективности и чувствительности, однако для его использования обязательным условием является наличие СО (Государственная Фармакопея Российской Федерации XIV издания, 2018; Европейская Фармакопей X издания, European Pharmacopoeia (Ph. Eur.) 10th Edition). Однако не всегда применение метода ВЭЖХ является обоснованным, поскольку в ряде случаев целесообразно определение именно суммы БАС с сопоставимыми физико-химическими и фармакологическими свойствами (Куркин В.А. и др., 2010; Куркин В.А., 2020).

Цель работы и основные задачи исследования. Целью настоящей работы является разработка методологической основы для обоснования подходов к стандартизации ЛРС и ЛРП, содержащих БАС ароматической и терпеноидной природ.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Обобщение и систематизация данных о химическом составе отдельных лекарственных растений, содержащих различные группы БАС ароматической и терпеноидной природы.
2. Научное обоснование методологии выделения веществ из изучаемых видов ЛРС (листья толокнянки обыкновенной, корневища и корни родиолы розовой, корни аралии маньчжурской, листья алоэ древовидного и др.).
3. Научное обоснование подходов к стандартизации сырья и ЛП фармакопейных растений, содержащих различные группы БАС ароматической и терпеноидной природы, с учетом данных о химическом составе (ведущая группа БАС, метод анализа).
4. Разработка концепции системного подхода к анализу ЛРС и ЛРП, включающей алгоритм выбора метода анализа ЛРС с учетом его целевого назначения, а также алгоритм разработки методики количественного определения БАС с учетом их физико-химических и спектральных характеристик.
5. Разработка методик количественного определения БАС в ЛРП с учетом принципа унификации методик в ряду «сырье - фармацевтическая субстанция - препарат».
6. Научное обоснование предельных значений показателей качества ЛРС и ЛП фармакопейных растений, содержащих различные группы БАС.
7. Разработка технологических способов получения лекарственных субстанций и препаратов, а также СО веществ из сырья некоторых видов фармакопейных растений.
8. Научное обоснование целесообразности применения в медицинских целях экстракционных препаратов, суммы БАС и индивидуальных соединений из исследуемых видов ЛРС.
9. Изучение зависимости в ряду «химический состав – фармакологические свойства» сырья и лекарственных препаратов фармакопейных растений.
10. Разработка проектов нормативной документации на изучаемые виды ЛРС, СО и ЛП (ФС, ФСП) на основе результатов фармакогностических, аналитических и фармакологических исследований.

Научная новизна. Изучение химического состава сырья и ЛП исследуемых фармакопейных растений позволило научно обосновать новые подходы к стандартизации с учетом данных о ведущей группе БАС и сформулировать концепцию системного подхода к анализу ЛРС и ЛРП, содержащих БАС ароматической и терпеноидной природы, включающая алгоритм выбора метода анализа ЛРС с учетом его целевого назначения, алгоритм разработки методики количественного определения БАС с учетом их физико-химических характеристик, принципы системного подхода к анализу ЛРС и ЛРП. Обосновано использование в

методиках качественного и количественного анализа СО сиринагина (сирени обыкновенной кора, элеутерококка колючего корневища и корни), розавина и салидрозиды (родиолы розовой корневища и корни), глицирама и ликуразиды (солодки корни), суммы аммонийных солей аралозидов (аралии маньчжурской корни), арбутина (толокнянки обыкновенной листья, брусники обыкновенной листья), смеси алоинов А и В и алоэнина (алоэ древовидного листья свежие). Разработаны проекты нормативных документов по качеству СО.

Предложены новые условия ВЭЖХ-анализа для количественного определения различных групп БАС в исследуемых видах ЛРС. Показано, что одной из важнейших характеристик оценки подлинности и степени чистоты арбутина как стандартного образца являются результаты ^1H -ЯМР-спектроскопии.

Обоснована возможность применения газохроматографического профиля для анализа компонентного состава эфирных масел видов ЛРС, биологическая активность которых обусловлена наличием этим масел.

На примере сырья толокнянки обыкновенной и аралии маньчжурской изучены взаимосвязи в ряду «химический состав – фармакологические свойства». Из листьев толокнянки обыкновенной выделено вещество с антибактериальной активностью - этиловый эфир *n*-дигалловой кислоты, который является новым природным соединением. Впервые выявлена антибактериальная активность этилового эфира *n*-дигалловой кислоты в отношении тестовых культур грамположительных бактерий *Bacillus cereus* и *Staphylococcus aureus*, грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*. Выделенная из толокнянки листьев 1,3,6-тригаллоилглюкоза в дозе 10 мг/кг способствовала значительной стимуляции диуреза на 34 % ($p = 0,014$) и натрийуреза на 37 % ($p = 0,015$) в течение 4 ч эксперимента, дополнительно стимулируя калийурез и креатининурез в течение 24 ч опыта на 36 % ($p = 0,048$) и на 48 % ($p = 0,003$), соответственно.

Научная новизна подтверждена наличием 9 патентов РФ на изобретения: «Способ получения вещества, обладающего диуретической активностью», «Сироп из смеси аммонийных солей аралозидов», «Сироп из настойки аралии маньчжурской», «Способ получения вещества, обладающего антибактериальной и противогрибковой активностью», «Сироп из плодов жостера слабительного», «Сироп из листьев сенны остролистной», «Сироп крушины ломкой», «Способ определения суммы сапонинов из корней аралии маньчжурской», «Антиоксидантное средство «Куркумы экстракт густой», при этом для разработанных препаратов и соединений продемонстрирована фармакологическая активность, что делает их перспективными в плане внедрения в медицинскую практику.

Теоретическая и практическая значимость.

В ходе выполнения диссертационного исследования разработаны методики анализа, а также обоснованы предельные значения показателей качества для исследуемых видов ЛРС, фитопрепаратов и СО («Алоэ древовидного листья

свежие», «Солодки голой корни», «Родиолы розовой корневища и корни», «Сирени обыкновенной кора», «Толокнянки обыкновенной листья», «Брусники обыкновенной листья», «Аралии маньчжурской корни», «Кверцетин-стандартный образец», «Рутин-стандартный образец», «Дигидрокверцетин-стандартный образец», «Сирингин-стандартный образец», «Розавин-стандартный образец», «Салидрозид-стандартный образец»), отражаемые в проектах фармакопейных статей, которые будут рекомендованы для включения в Государственную фармакопею РФ.

В рамках выполнения темы исследования разработаны способы получения лекарственных препаратов «Сироп крушины ломкой» (патент РФ), «Сироп из листьев сенны остролистной» (патент РФ), «Сироп из плодов жостера слабительного» (патент РФ), «Сироп из смеси аммонийных солей аралозидов» (патент РФ), «Сироп из настойки аралии маньчжурской» (патент РФ), способы получения веществ с антибактериальной и противогрибковой активностью и диуретической активностью (патенты РФ), а также способ выделения суммы сапонинов из корней аралии маньчжурской (патент РФ). Предложены технологии получения препарата «Элеутерококка сироп», «Толокнянки сироп», «Брусники сироп».

Проведена работа по совершенствованию подходов к качественному и количественному анализу лекарственных препаратов «Элеутерококка экстракт жидкий», Грудные сборы № 2 и № 4, «Солодки сироп». В процессе создания новых лекарственных препаратов на основе изучаемых видов ЛРС будут предложены новые лекарственные средства («Элеутерококка сироп» и др.). Успешное решение проблемы создания и стандартизации фитопрепаратов, в том числе импортозамещающих лекарственных средств, будет способствовать реализации Стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 г.

Внедрение в практику.

В результате проведенных исследований разработаны:

– фармакопейные статьи «Черники обыкновенной плоды», «Аронии черноплодной плоды свежие» (раздел «Количественное определение»), «Жостера слабительного плоды» (раздел «Количественное определение»), включенные в Государственную фармакопею Российской Федерации XIV издания;

– методики качественного и количественного анализа сирингина (сирени обыкновенной кора, элеутерококка колючего корневища и корни), розавина и салидрозида (родиолы розовой корневища и корни), глицирама и ликуразида (солодки корни), суммы аммонийных солей аралозидов (аралии маньчжурской корни), арбутина (толокнянки обыкновенной листья, брусники обыкновенной листья), смеси алоинов А и В и алоэина (алоэ древовидного листья свежие);

– способы получения и методики стандартизации новых лекарственных препаратов «Сироп крушины ломкой», «Сироп из листьев сенны остролистной»,

«Сироп из плодов жостера слабительного», «Сироп из смеси аммонийных солей аралозидов», «Сироп из настойки аралии маньчжурской»;

– способы получения веществ с антибактериальной и противогрибковой активностью и диуретической активностью, а также способ выделения суммы сапонинов из корней аралии маньчжурской;

– разработанные в результате проведенных исследований методики анализа сырья и препаратов, содержащих БАС ароматической и терпеноидной природы, апробированы и внедрены в работу ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», ЗАО «Самаралектравы», ООО «БЭГРИФ».

– фрагменты диссертационного исследования находят применение в научной и учебной работе кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, кафедры управления и экономики фармации, кафедры фармацевтической технологии с курсом биотехнологий ФГБОУ ВО СамГМУ Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедры фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России, кафедры управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии ФГБОУ ВО ОрГМУ Минздрава России, кафедры фармакогнозии ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России.

Методология и методы исследования.

Методологической основой исследования является поиск, анализ и систематизация литературных данных в области стандартизации ЛРС и ЛРП, содержащих БАС ароматической и терпеноидной природы: степень изученности химического состава ЛРС и фармакологических свойств, подходы к стандартизации сырья, разработка нормативной документации на ЛРС, обобщение материалов в виде выводов, определяющих теоретическое и практическое значение диссертационной работы.

При выполнении фармакогностического исследования применяли физико-химические (УФ-спектроскопия, ВЭЖХ, газовая хромато-масс-спектрометрия), химические, фармакологические, а также статистические методы анализа.

Результаты исследований являются методологической основой для дальнейших фундаментальных исследований по проблеме стандартизации ЛРС и ЛРП, содержащих различные группы БАС, а также создания ЛП нейротропного, антибактериального, диуретического действия.

Разработанные методические и методологические подходы к стандартизации ЛРС фармакопейных растений, содержащих БАС ароматической и терпеноидной природы, применимы и для других растений, содержащих различные группы БАС.

Положения, выдвигаемые на защиту:

– Востребованность разработки национальных СО, в том числе природного происхождения, и применения системного подхода к анализу ЛРС и препаратов на его основе.

– Методологические подходы к выделению веществ аралии маньчжурской, толокнянки обыкновенной, алоэ древовидного, брусники

обыкновенной, сирени обыкновенной, солодки голой и солодки уральской, изучению состава некоторых эфиромасличных растений, произрастающих и культивируемых в Самарской области.

– Методологические подходы к анализу фенилпропаноидов, тритерпеновых сапонинов, флавоноидов и других БАС ароматической и терпеноидной природы.

– Методики количественного анализа БАС ароматической и терпеноидной природы в ЛРС «Алоэ древовидного листья свежие», «Солодки голой корни», «Родиолы розовой корневища и корни», «Сирени обыкновенной кора», «Толокнянки обыкновенной листья», «Брусники обыкновенной листья», «Аралии маньчжурской корни» с использованием стандартных образцов.

– Теоретическое обоснование и экспериментальное подтверждение состава и технологии получения ЛРП, содержащих различные группы БАС;

– Методики количественного анализа БАС ароматической и терпеноидной природы в коммерческих и экспериментальных ЛРП «Элеутерококка экстракт жидкий», Грудные сборы № 2 и № 4, «Солодки сироп», «Алоэ сок», «Алоэ экстракт жидкий», «Сирени настойка», «Элеутерококка сироп», «Толокнянки сироп», «Аралии сироп» и др.

– Показатели качества для ЛРС и ЛРП, содержащих БАС ароматической и терпеноидной природы.

– Результаты исследований фармакологической активности ЛРП на основе ЛРС, содержащего БАС ароматической и терпеноидной природы.

– Выявление БАС, вносящих существенный вклад в фармакологическую активность суммарных извлечений толокнянки обыкновенной, аралии маньчжурской.

– Разработаны проекты ФС на СО «Розавин-стандартный образец», «Кверцетин-стандартный образец», «Рутин-стандартный образец», «Дигидрокверцетин-стандартный образец», «Салидрозид-стандартный образец», «Сирингин-стандартный образец».

Степень достоверности.

Научные положения, выводы диссертационной работы основываются на большом объеме экспериментального материала, полученного с использованием современных физико-химических (колоночная хроматография, ТСХ, ВЭЖХ, УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия) и фармакологических методов, что подтверждается большим количеством таблиц, рисунков, схем хроматограмм. Статистическая обработка результатов проводилась в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» и ОФС.1.1.0014.15 «Статистическая обработка результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами». Разработанные методики количественного определения валидированы.

Апробация работы. Материалы работы доложены и обсуждены на 82-й Всероссийской итоговой молодежной научной конференции с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины» (г. Уфа, 2017 г.), научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые – от технологий XXI века к практическому здравоохранению» (г. Самара, 2016 г.), научно-практической конференции с международным участием «Молодые учёные XXI века - от идеи к практике», посвященной 85-летию Клиник СамГМУ (г. Самара, 2015 г.), межвузовской конференции «Современные проблемы фармакогнозии» (г. Самара, 2016 г.), III Межвузовской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию Самарского государственного медицинского университета «Современные проблемы фармакогнозии» (г. Самара, 2018 г.), X Международном симпозиуме «Фенольные соединения: свойства, активность, инновации» (г. Москва, 2018 г.), 7-й Международной научно-методической конференции "Фармообразование-2018" (г. Воронеж, 2018 г.), Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Исследования молодых ученых в решении актуальных проблем медицинской науки и практики, Аспирантские чтения-2018» (г. Самара, 2018 г.), II Международной научной конференции «Роль метабомики в совершенствовании биотехнологических средств производства» (г. Москва, 2019 г.), Международной научной конференции «От растения до лекарственного препарата» (г. Москва, 2020 г.), 72-й научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы современной медицины и фармации» (г. Витебск, 2020 г.), Юбилейной международной научной конференции «90 лет - от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы» (г. Москва, 2021 г.), Всероссийской научно-практической онлайн-конференции с международным участием «Фармацевтическое образование СамГМУ. история, современность, перспективы», посвященной 50-летию фармацевтического образования СамГМУ (г. Самара, 2021 г.), IX Международной научная конференция молодых ученых «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» (г. Москва, 2021 г.), XI Международном симпозиуме «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (г. Москва, 2022 г.), Международной научной конференции «От биохимии растений к биохимии человека» (г. Москва, 2022 г.).

Связь темы исследований с планом научных работ. Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическом планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России (№ Гос. регистрации 01200900568 до 28.04.2015; с 28.04.2015 № Гос. регистрации 115042810034; наименование НИОКР - «Комплексные исследования по разработке лекарственных средств природного и синтетического происхождения»; с 14.05.2019 № Гос. Регистрации АААА-А19-119051490148-7, наименование НИОКР – «Химико-фармацевтические, биотехнологические, фармакологические и организационно-экономические

исследования по разработке, анализу и применению фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов»).

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликованы 59 научных работ, в том числе 20 статей в журналах, рецензируемых ВАК Минобрнауки России, из них 13 работ в журналах, индексируемых в международной наукометрической базе данных Scopus. Получено 9 патентов РФ на изобретение, в Государственную фармакопею Российской Федерации XIV издания включены фармакопейные статьи, разработанные при участии автора: «Черники обыкновенной плоды», «Аронии черноплодной плоды свежие» (раздел «Количественное определение»), «Жостера слабительного плоды» (раздел «Количественное определение»).

Личный вклад автора. Автором лично выбраны объекты исследования, направление исследований, поставлены цели и задачи исследования. Автором проведен научно-информационный поиск, проведены экспериментальные исследования. В сборе, анализе, систематизации и обобщении полученных результатов доля автора является определяющей. Значительная часть экспериментальных результатов, приведенных в диссертации, получены самим автором.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Диссертационная работа соответствует паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, конкретно пунктам 2, 3, 6.

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 368 страницах машинописного текста, содержит 68 таблиц, 76 рисунков. Диссертационная работа включает введение, обзор литературы, описание объектов и методов, использованных при выполнении диссертационного исследования, 6 глав, описывающих результаты собственных исследований, заключение, список литературы, состоящий из 322 источников, в том числе 224 – на иностранных языках, 25 приложений.

Во **введении** отражена актуальность диссертационной работы, определены цель и задачи исследования, представлена научная новизна и практическая значимость проводимого исследования, изложены основные положения, которые выносятся на защиту, приведены сведения о публикациях и апробации работы.

Глава 1 включает обзор литературы отечественных и зарубежных авторов на предмет исследований ЛРС и ЛРП, содержащих БАС ароматической и терпеноидной природы. В главе изложены история и актуальные аспекты разработки ЛРС и ЛРП, содержащих БАС ароматической и терпеноидной природы, классификация природных БАС, современные представления о биологической активности фармакопейных растений, содержащих различные группы БАС. Приведена информация о подходах к анализу сырья фармакопейных растений, содержащих БАС фенольной и терпеноидной природы, применяемых в РФ и других странах.

В **главе 2** представлены объекты и использованные методы исследования.

В **главе 3** изложены результаты фитохимических исследований ЛРС фармакопейных растений, содержащих тритерпеновые сапонины (корни солодки, корни аралии маньчжурской, а также приведены результаты исследований по разработке методик качественного и количественного анализа этой группы соединений.

Глава 4 посвящена результатам фитохимических исследований ЛРС фармакопейных растений, содержащих простые фенолы (листья толокнянки обыкновенной, листья брусники обыкновенной), в том числе по разработке методик количественного определения арбутина.

В **главе 5** изложены методологические подходы к стандартизации и методики анализа ЛРС, содержащего фенилпропаноиды (корневища с корнями родиолы розовой, кора сирени, корневища с корнями элеутрококка колючего).

В **главе 6** представлены результаты фармакогностических исследований ЛРС фармакопейных растений, содержащих флавоноиды и другие группы фенольных соединений. Обоснованы технологические схемы получения нескольких СО (рутина, кверцетин, дигидрокверцетин), подходы к стандартизации цветков бессмертника песчаного, листьев алоэ древовидного.

В **главе 7** изложены результаты исследований компонентного состава эфирных масел растительного сырья растений, произрастающих или культивируемых на территории Самарской области, методом хромато-масс-спектрометрии.

В **главе 8** сформулирована концепция системного подхода к анализу ЛРС фармакопейных растений, содержащих БАС ароматической и терпеноидной природы, на основании систематизации полученных результатов экспериментальных исследований, обоснованы составы, технологии получения и методики анализа препаратов из изученных видов ЛРС. Описаны результаты изучения фармакологической активности препаратов, индивидуальных соединений или смеси соединений корней аралии маньчжурской, толокнянки обыкновенной, листьев сенны остролистной, коры крушины ломкой и плодов жостера слабительного.

Диссертация завершается заключением и списком литературы.

В приложениях представлены в сравнительном аспекте данные о ЛРС, СО и подходах к стандартизации эфиромасличных растений в Государственной Фармакопее РФ XIV издания и Европейской Фармакопее X издания, патенты РФ на изобретение № 2671408 «Способ получения вещества, обладающего диуретической активностью», № 2660555 «Сироп из смеси аммонийных солей аралозидов», № 2665163 «Сироп из настойки аралии маньчжурской», № 2665167 «Способ получения вещества, обладающего антибактериальной и противогрибковой активностью», № 2582276 «Сироп из плодов жостера слабительного», № 2582982 «Сироп из листьев сенны остролистной», № 2557929 «Сироп крушины ломкой», № 2591081 «Способ получения суммы сапонинов из корней аралии маньчжурской», № 2650642 «Антиоксидантное средство «Куркумы экстракт густой», проекты фармакопейных

статей «Рутин-стандартный образец», «Кверцетин-стандартный образец», «Дигидрокверцетин-стандартный образец», «Сирингин-стандартный образец», «Розавин – стандартный образец», «Салидрозид – стандартный образец», акты внедрения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Объекты и методы исследования

Объектами исследования являлись образцы 15 видов ЛРС и ЛРП на их основе:

- промышленные образцы корней аралии маньчжурской (ООО «Экогрин», 2014 г.) и образцы ЛРП «Аралии настойка» (ОАО «Дальхимфарм» и ОАО «Тверская фармацевтическая фабрика»),

- корни солодки голой и солодки уральской, культивируемые в Ботаническом саду Самарского университета и заготовленные в 2018 г. и 2021 г., и коммерческие образцы корней солодки голой (АО «Красногорсклексредства», ООО «АЛСУ»),

- побеги черники обыкновенной, заготовленные в Пензенской области, Сосновоборский район, пос. Сосновоборск, 2012 г. и в Республике Марий Эл, Волжский район, г. Волжск, 2013 г.;

- листья брусники обыкновенной, заготовленные в Республике Марий Эл, Волжский район, г. Волжск, 2012 и 2013 гг.;

- листья бадана толстолистного, культивируемого в Самарской области (2017 г.);

- образцы корневищ и корней родиолы розовой, заготовленные в 2016-2018 гг. (Алтайский край) и экспериментальные и промышленные образцы экстракта жидкого корневищ и корней родиолы розовой;

- образцы сирени обыкновенной, заготовленные в 2018-2020 г. в Ботаническом саду Самарского университета, в Самарской (с. Верхний Сускан, с. Ермаково) и Саратовской (с. Натальино) областях;

- образцы корневищ и корней элеутерококка колючего, заготовленные в Хабаровском крае в 2015-2018 гг.;

- цветки липы сердцевидной (*Tilia cordata* Mill.), заготовленные в июне 2018 г. в Самарской области;

- трава тимьяна ползучего, трава душицы обыкновенной, заготовленные в июне 2017 г. на территории Самарской области;

- цветки пижмы обыкновенной, заготовленные в июле 2016 г. в г. Самара;

- трава шалфея сухостепного, заготовленная в июне 2017 г. в Самарской области;

- трава змееголовника молдавского, заготовленная в июне 2017 г. на территории Самарской области;

- свежие листья алоэ древовидного, культивируемого на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, собранные в летне-осенний период 2020 г., и лекарственные препараты «Алоэ сок» (производитель ЗАО

«Вифитех»), «Алоэ экстракт жидкий», раствор для подкожного введения (производители ЗАО «Вифитех», ОАО «Дальхимфарм»).

В качестве объектов исследования также использовали субстанции и индивидуальные соединения: СО монозамещенной аммониевой соли глицирризиновой кислоты (глицирам) (ФС 42-0034-00) и ликуразида (ФС 42-2573-88), СО арбутина (производства «Sigma-Aldrich», США), ГСО сиринагина (ВФС 42-2088-92), розавина (ФС 42-0071-01), рутина, кверцетина, дигидрокверцетина, изосалипурпозиды, рабочие стандартные образцы глицирризиновой кислоты, дигидрокверцетина, барбалоина и алоэина, салидрозиды, 7-О-глюкозида изофраксидина, элеутерозиды D, хлорогеновой кислоты со степенью чистоты не менее 95,0 %, образцы субстанции «Сапарал» с содержанием суммы аралозидов 85,0 %.

Для проведения фитохимических исследований получали водно-спиртовое извлечение из 50-200 г ЛРС методом модифицированной мацерации (экстрагент – 70% этанол). Хроматографическое разделение преимущественно проводили на сорбенте силикагеле L40/100 с использованием в качестве элюентов хлороформа, спирто-хлороформных смесей в различных соотношениях, 95% этанола. Очистку веществ проводили рехроматографией на полиамиде (Woelm) и силикагеле L40/100 и перекристаллизацией. Структуру веществ определяли с использованием УФ-, ¹H-ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, различных химических превращений.

Пробоподготовка для целей количественного определения заключалась в однократной экстракции БАС из сырья водно-этанольными смесями на кипящей водяной бане при соотношении «сырье – экстрагент» от 1:30 до 1:100 в течение от 30 до 120 мин.

Эфирные масла получали в соответствии с требованиями ОФС.1.5.3.0010.15 (ГФ РФ XIV издания) и указаниями фармакопейных статей на соответствующий вид ЛРС. При проведении парофазного анализа образец ЛРС массой 1 г помещали в пенициллиновый флакон, которые герметично закрывали резиновой пробкой с фторопластовой прокладкой. Контейнер с образцом термостатировали при температуре 100°C в течение 60 мин.

Для изучения компонентов эфирного масла, которые переходят в водно-спиртовое извлечение из ЛРС, 1,0 г сырья помещали в коническую колбу со шлифом вместимостью 50 мл, добавляли 10 мл 70% этанола и выдерживали на кипящей водяной бане в течение 15 мин с обратным холодильником. После охлаждения полученное водно-спиртовое извлечение обрабатывали двукратно гексаном порциями по 5 мл, каждый раз отделяя верхний (гексановый) слой. Объединенное гексановое извлечение упаривали до объема примерно 1 мл

Разделение методом ТСХ проводили на хроматографических пластинках «Силуфол УФ-254», «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ» или «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ».

ЯМР-спектры регистрировали на приборе «Bruker AM 300» (300 МГц). Масс-спектры электронного удара регистрировали на масс-спектрометре «Kratos MS-30» при энергии ионизирующих электронов 70 эВ и варьировании температуры ионного

источника от 100 до 250 °С. Определение температуры плавления выделенных веществ осуществляли на блоке Кофлера.

Регистрацию электронных спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena) в диапазоне длин волн 190-700 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм. Результаты измерений обрабатывались с помощью программ WinASPECT и Microsoft Excel.

ВЭЖХ-анализ осуществляли с использованием хроматографа «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») в следующих условиях: метод обращенно-фазовой хроматографии, изократический режим, колонка «КАХ-6-80-4» (2 мм x 80 мм; Сепарон-С18, 7 мкм), подвижная фаза – ацетонитрил: 1% раствор уксусной кислоты в воде в различных соотношениях (в зависимости от анализируемых БАС), скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента – 1500-2500 мкл. Детекция спектрофотометрическая, длину волны определяли в зависимости от спектральных характеристик анализируемых соединений. Объемы инжестируемых проб составляли от 1 до 10 мкл.

Компонентный состав эфирных масел определяли с помощью газового хроматографа «МАЭСТРО 7820» с масс-спектрометром модели Agilent 5975 и автоинжектором. Анализ проводили с использованием капиллярной кварцевой колонки HP-5ms 30 м×0,25 мм×0,25 мкм (неподвижная фаза: 5%-дифенил-95%-диметилсилоксан).

Статистическую обработку результатов количественного определения проводили в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента». Валидационная оценка методик количественного определения проводилась по показателям: специфичность, линейность, правильность (открываемость), прецизионность (ОФС.1.1.0012.15 Валидация аналитических методик).

В исследовании также использованы механические (отжим свежих листьев алоэ, измельчение и смешение твердых материалов, просеивание, обработка материалов прессованием), гидромеханические (фильтрование, перемешивание в жидких средах), тепловые (нагрев, выпаривание) и массообменные (сушка, экстракция, растворение) процессы.

Изучение нейротропной активности препаратов аралии маньчжурской проводили на белых беспородных крысах с использованием экспериментальной установки «открытое поле». Изучение диуретической и слабительной активности проводили на белых беспородных крысах обоего пола массой 180-250 г. Значимость различий между указанными параметрами среди опытной и контрольной групп животных оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни. Различия считали существенными при $p \leq 0,05$.

2. Обоснование подходов к стандартизации ЛРС и ЛРП, содержащих тритерпеновые сапонины

2.1. Разработка подходов к стандартизации сырья и препаратов аралии маньчжурской

Одними из объектов, содержащих в качестве основной группы БАС тритерпеновые сапонины и в отношении которых остаются нерешенными проблемы стандартизации, являются корни аралии маньчжурской (*Aralia elata* (Miq.) Seem., синоним: *A. mandshurica* Rupr. et Maxim.), а также корни солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.).

Нами были разработаны подходы для оценки количественного содержания сапонинов (аралозидов) в сырье и препаратах аралии маньчжурской с использованием в качестве СО суммы аммонийных солей аралозидов, обозначаемых как «Сапарал».

С целью разработки методики количественного определения аралозидов изучены спектры поглощения извлечения из корней аралии маньчжурской и «Сапарала» после взаимодействия с концентрированной серной кислотой. Выявлены два общих максимума поглощения при длинах волн 318 ± 2 нм и 510 ± 2 нм (рис. 1, в и г). Изучение исходных спектров «Сапарала» и извлечения из корней аралии маньчжурской (рис. 1, а и б) показало, что они поглощают в диапазоне от 290 до 330 нм (максимумы поглощения при 304 ± 2 и 328 ± 2 нм).

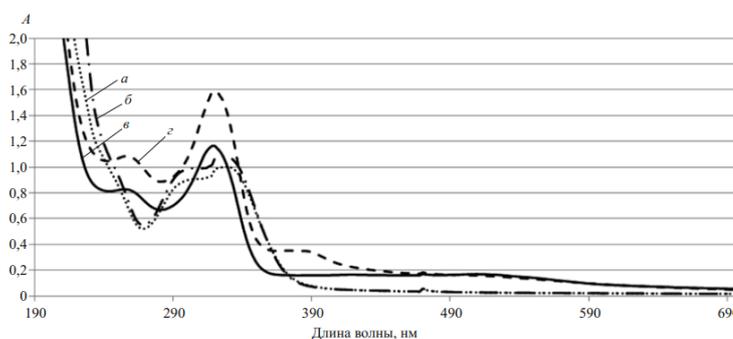


Рисунок 1. Спектры поглощения исходного раствора сапарала (а), извлечения из корней аралии маньчжурской (б), раствора сапарала после взаимодействия с концентрированной серной кислотой (в), извлечения из корней аралии маньчжурской после взаимодействия с концентрированной серной кислотой (г).

В качестве аналитической нами была выбрана длина волны 510 нм по аналогии с известными методиками по определению сапонинов в корнях женьшеня. Расчет количественного содержания проводили с использованием данных по «Сапаралу» или (в случае отсутствия рабочего СО «Сапарала») с использованием значения его удельного показателя поглощения после взаимодействия с концентрированной серной кислотой с учетом содержания в нем суммы аралозидов – 85,06% (56,0). Выбор «Сапарала» обусловлен тем, что он соответствует аммонийной соли аралозидов А, В, С с усредненной молекулярной массой, в пересчете на которую проводится количественное определение в фармакопейной статье.

Определена эффективность экстракции аралозидов при использовании различных водно-спиртовых смесей (40 %, 70 % и 95 % этанол) и воды, влияние времени экстракции (30, 60 и 90 мин) и соотношения «сырье : экстрагент» (1:30; 1:50 и 1:100). Установлено, что оптимальными условиями экстракции являются

следующие условия: 70 % этанол, соотношение «сырье : экстрагент» 1:50, время экстракции – 60 мин. Результаты статистической обработки проведенных опытов показывают, что относительная ошибка среднего арифметического результата определения суммы сапонинов в корнях аралии маньчжурской с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 1,43\%$.

В дальнейшем разработанная методика была унифицирована для анализа коммерчески доступных препаратов аралии маньчжурской – настоек производства ОАО «Дальхимфарм», Россия. Содержание суммы сапонинов в проанализированных образцах настоек аралии маньчжурской варьировало от $1,51 \pm 0,05\%$ до $1,72 \pm 0,06\%$.

2.1. Разработка подходов к стандартизации сырья и препаратов корней солодки

С учетом значимого вклада флавоноидов в биологическую активность сырья и препаратов солодки, на наш взгляд, целесообразным является включение в фармакопейную статью на корни солодки ВЭЖХ-анализа как глицирризиновой кислоты, так и диагностически значимого флавоноида – ликуразида. Хроматографическое разделение проводили в изократическом режиме с использованием в качестве подвижной фазы смеси ацетонитрила и 1% раствора уксусной кислоты в воде в соотношении 4:6 (при определении содержания глицирризиновой кислоты) или 2:8 (при определении содержания ликуразида). Детекцию веществ осуществляли при длинах волны 256 нм (глицирризиновая кислота) и 360 нм (ликуразид).

Метрологические характеристики предлагаемых ВЭЖХ-методик свидетельствуют о том, что относительная ошибка определения среднего арифметического результата содержания глицирризиновой кислоты в корнях солодки с доверительной вероятностью 95 % составляет $\pm 4,11\%$, ликуразида – $\pm 4,76\%$. Средний процент восстановления составил 97,2 % и 96,5 % соответственно. Зависимость высоты и площади хроматографического пика от концентрации глицирама описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 0,18 до 1,47 мг/мл, для ликуразида – в диапазоне концентраций от 0,14 до 0,71 мг/мл.

Из исследованных концентраций 40% этанол показал более высокие значения эффективности экстракции глицирризиновой кислоты, несмотря на то что для ликуразида более высокий выход был продемонстрирован при использовании 70 % этанола (по сравнению с 40 % этанолом различия были статистически значимыми: $t_{\text{выч}} = 5,01 > t(95\%; 10)$; $F_{\text{выч}} = 1,46 < F(95\%; 5; 5)$). Однако, с учетом того факта, что глицирризиновая кислота является БАС, определяющим основную фармакологическую активность корней солодки, нами для методики количественного определения был выбран 40 % этанол.

С использованием предлагаемых методик проанализирован ряд образцов ЛРС. Содержание глицирризиновой кислоты (в пересчете на глицирам) в корнях солодки варьировало от 3,24 % до 4,49 %; ликуразида – от 0,200 % до 0,321 %. Впоследствии было определено содержание глицирризиновой кислоты и ликуразида

в лекарственных препаратах «Фитопектол № 2 грудной сбор», «Грудной сбор № 4» (АО «Красногорсклексредства», Россия), «Сироп корня солодки» (ОАО «Самарамедпром», Россия), «Солодки сироп» (ОАО «Ивановская фармацевтическая фабрика», Россия). Содержание глицирризиновой кислоты в сиропах было не менее 0,03%, в «Фитопектоле № 2» (грудной сбор № 2) – 0,3%, в «Грудном сборе № 4» – 0,6%.

3. Обоснование подходов к стандартизации ЛРС и ЛРП, содержащих простые фенолы

Одним из наиболее известных химических соединений, относящихся к группе простые фенолы, является арбутин, с которым связывают фармакологическую активность широко представленных на фармацевтическом рынке РФ ЛРП с диуретической и антисептической активностью, в частности получаемых из листьев толокнянки обыкновенной [*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng., сем. Вересковые – *Ericaceae*] и брусники обыкновенной (*Vaccinium vitis-idaea* L., сем. Брусничные – *Vacciniaceae*).

3.1. Разработка методики оценки подлинности арбутинсодержащего лекарственного растительного сырья и препаратов

На примере листьев толокнянки обыкновенной и брусники обыкновенной было проведено сравнительное исследование разделительной способности различных подвижных фаз (хлороформ – этанол 96% (6:4), хлороформ – этанол 96% – вода (26:16:3) и *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2)) в отношении выявления арбутина.

Во всех рассматриваемых условиях хроматографического разделения присутствие арбутина маскируются другими соединениями, также реагирующими с диазореактивом. Для очистки извлечений от сопутствующих компонентов (флавоноидов, дубильных веществ и других полифенольных соединений), нами проводилась их предварительная очистка путем фильтрования через слой алюминия оксида (х.ч., нейтральный II по Брокману, «Реахим») (рис. 2).

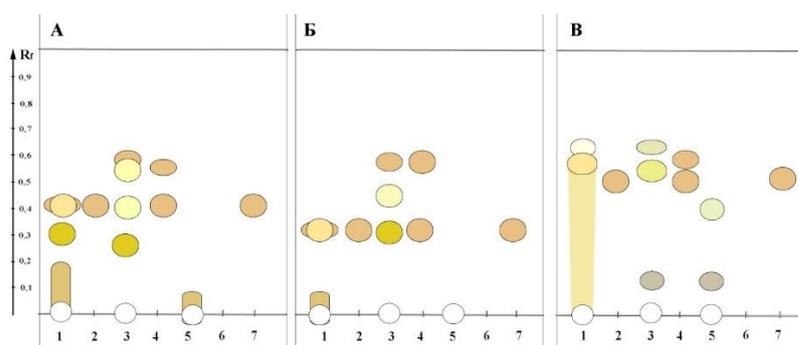


Рисунок 2.
Хроматограммы извлечений из листьев толокнянки, брусники и побегов черники до и после твердофазной экстракции в разных системах растворителей

Обозначения: А – подвижная фаза: хлороформ – этанол 96% (6:4 об/об); Б – подвижная фаза: хлороформ – этанол 96% – вода (26:16:3 об/об/об); В – подвижная фаза: *n*-бутанол – ледяная уксусная кислота – вода (4:1:2 об/об/об)

Из исследуемых хроматографических систем наибольшей разрешающей способностью по отношению к арбутину и химически родственному соединению

обладала подвижная фаза хлороформ – этанол 96% – вода (26:16:3) (больше 1,0). Оптимальной для разделения этих веществ также являлась система хлороформ – спирт этиловый 96% (6:4) (разрешающая способность примерно равна 0,6).

3.2. Изучение химического состава листьев толокнянки обыкновенной и обоснование методологии выделения арбутина из лекарственного растительного сырья хроматографическими методами

Общая схема выделения основных компонентов листьев толокнянки обыкновенной представлена на рис. 3.



Рисунок 3. Схема выделения основных компонентов из листьев толокнянки обыкновенной

Этиловый эфир *p*-дигалловой кислоты (соединение 1) впервые выделен из объектов природного происхождения), 1,3,6-тригаллоилглюкоза (соединение 2) впервые выделен из листьев толокнянки) (рис. 4).

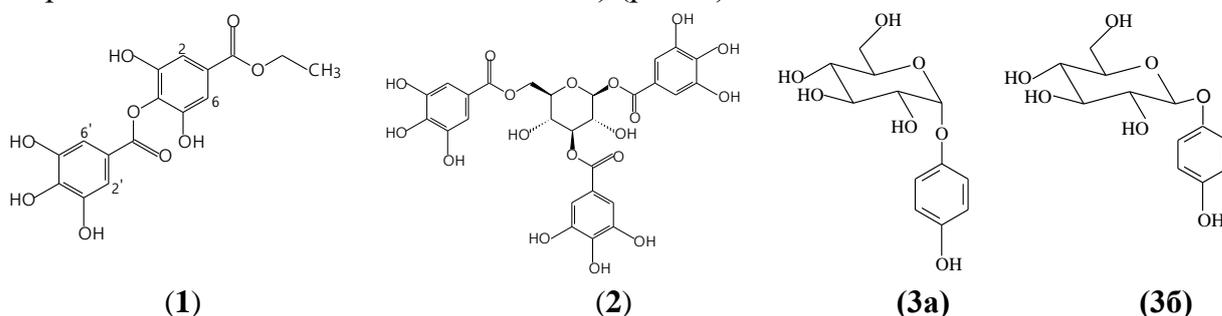


Рис. 4. Структурные формулы некоторых веществ, выделенных из листьев толокнянки обыкновенной

В результате колоночной хроматографии из листьев толокнянки обыкновенной выделено два образца вещества 3а (1-О- α -D-глюкопиранозид гидрохинона – α -арбутин) и пять образцов вещества 3б (1-О- β -D-глюкопиранозид гидрохинона – арбутин) (рис. 4). Принципиальным различием в ^1H -ЯМР-спектрах

соединений **3a** и **3b** являются значения констант спин-спинового взаимодействия (КССВ) и величина химического сдвига аномерного протона глюкозы (C-1¹). В ¹H-ЯМР-спектре соединения **3a** КССВ составляет 3.5 Гц, а величина химического сдвига – 5.23 м.д., тогда как в случае соединения **3b** – 7 Гц при 4.64 м.д., что свидетельствует об α-конфигурации гликозидной связи в соединении **3a** и β-конфигурации гликозидной связи в соединении **3b**.

3.3. Разработка подходов к стандартизации арбутинсодержащего лекарственного растительного сырья

Нами разрабатывались условия для определения количественного содержания арбутина в арбутинсодержащем ЛРС. Определение арбутина проводили с использованием методов титриметрии, прямой спектрофотометрии и ВЭЖХ.

Содержание арбутина в исследуемом образце листьев толокнянки обыкновенной при использовании метода йодометрического титрования (ГФ СССР XI издания) составило 10,59±0,70%, в образцах листьев брусники обыкновенной – 11,68%±0,72%.

Спектрофотометрическое определение проводили при аналитической длине волны 280 нм после фильтрования через слой алюминия оксида с использованием полученного значения удельного показателя поглощения арбутина, который составил 77,3±3,1. По результатам спектрофотометрического анализа извлечения из листьев толокнянки, полученного с использованием 40% спирта этилового, содержание арбутина в сырье составило 15,70±0,40%, в извлечении из листьев брусники содержание арбутина в сырье варьировало от 14,46±0,41% до 14,62±0,42%.

Завышенные результаты количественного определения арбутина, полученные с использованием йодометрического и спектрофотометрического методов, по-видимому, связаны с наличием в анализируемых извлечениях сопутствующих веществ, способных соответственно окисляться или поглощать в области 280 нм.

ВЭЖХ-анализ проводили с использованием в качестве подвижной фазы смеси 0,01 М раствора КН₂РO₄, подкисленного Н₃РO₄ до рН 3,00±0,01, и ацетонитрила в соотношении 8:2 для суммарных (неочищенных) извлечений и 9:1 для этих же извлечений после фильтрования через слой алюминия оксида. Принимая во внимание то обстоятельство, что пробоподготовка на данном сорбенте позволяет эффективно очистить анализируемое извлечение от сопутствующих веществ без потери целевого соединения, количественное определение арбутина осуществляли в условиях после предварительной очистки (рис. 5-8).

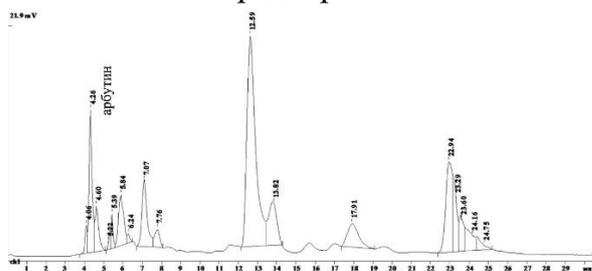


Рисунок 5. ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из листьев толокнянки обыкновенной (экстрагент – 40 % этанол)

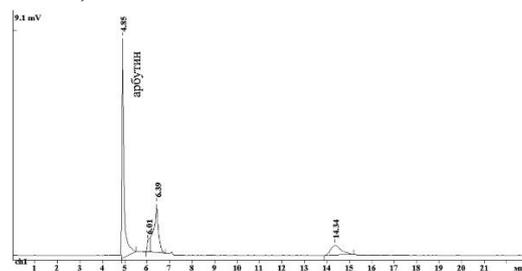


Рисунок 6. ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из листьев толокнянки обыкновенной после очистки

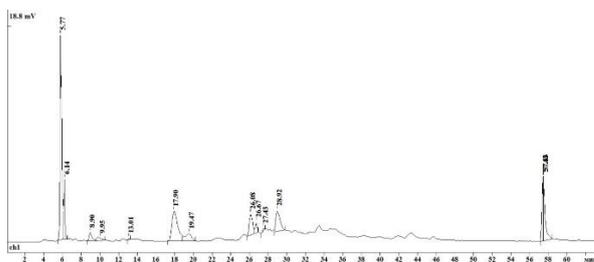


Рисунок 7. ВЭЖХ-хроматограмма водного извлечения из листьев брусники обыкновенной

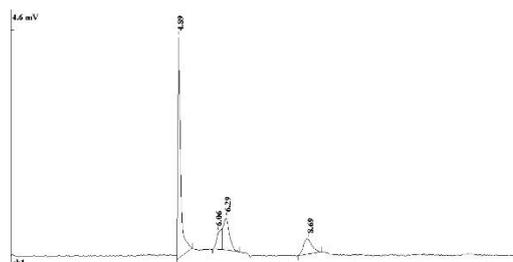


Рисунок 8. ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из листьев брусники обыкновенной после очистки

Метрологические характеристики рассматриваемых методик определения содержания арбутина в листьях толокнянки обыкновенной и брусники обыкновенной представлены в табл. 1.

Таблица 1. Метрологические характеристики методик количественного определения арбутина

Метод	f	\bar{X}	S	$P, \%$	$t(P, f)$	ΔX	$\bar{\epsilon}, \%$
<i>Толокнянка обыкновенная</i>							
Йодометрия	5	10,59	0,6671	95	2,57	0,70	6,61
УФ-спектрометрия	5	15,70	0,3812	95	2,57	0,40	2,55
ВЭЖХ	5	11,16	0,3336	95	2,57	0,35	3,14
<i>Брусника обыкновенная</i>							
Йодометрия	5	11,68	0,6862	95	2,57	$\pm 0,72$	$\pm 6,16$
УФ-спектрометрия	5	14,50	0,4003	95	2,57	$\pm 0,42$	$\pm 2,90$
ВЭЖХ	5	4,80	0,0953	95	2,57	$\pm 0,10$	$\pm 2,08$

При разработке методики для листьев толокнянки обыкновенной сравнивались экстракционная способность спиртов различных концентраций, влияние соотношения «сырье : экстрагент» и времени экстрагирования. Определено, что наибольшей экстракционной способностью обладает спирт этиловый 40%, наибольший выход достигается при соотношении «сырье : экстрагент» - 1:50; время экстракции - 60 мин на кипящей водяной бане. Оптимальным экстрагентом в случае листьев брусники обыкновенной является вода, наибольший выход достигается при соотношении «сырье : экстрагент» 1:50; оптимальное время экстракции - 60 мин на кипящей водяной бане.

Содержание арбутина в листьях толокнянки варьировало от 10,85 % \pm 0,24 % до 11,16 \pm 0,35 %, в исследуемых образцах листьев брусники обыкновенной – от 4,80 % \pm 0,10 % до 4,97 % \pm 0,11%.

4. Обоснование подходов к стандартизации ЛРС и ЛРП, содержащих фенилпропаноиды

4.1. Разработка подходов к стандартизации сырья и препаратов родиолы розовой

Стандартизация сырья и препаратов родиолы розовой в ГФ РФ XIV издания (ФС.2.5.0036.15 «Родиолы розовой корневища и корни» и ФС.3.4.0008.18 «Родиолы

розовой корневищ и корней экстракт жидкий») предусматривает количественное определение содержания салидрозида и суммы гликозидов коричневого спирта в пересчете на розавин^{1,2}. Анализ проводят методом ВЭЖХ с УФ-детектированием (219 нм – определение салидрозида, 250 нм – определение суммы гликозидов коричневого спирта в пересчете на розавин).

В целях стандартизации сырья более концептуально верным подходом является количественное определение содержания не суммы гликозидов коричневого спирта, а наиболее лабильного компонента – розавина. Уровень его содержания надежно отражает правильность условий хранения и сушки корневищ и корней родиолы розовой. Эти предположения подтверждаются результатами выборочного контроля качества сырья и препаратов родиолы розовой. Booker A. и соавт. в результате анализа 40 коммерческих продуктов родиолы розовой разных поставщиков, представленных на рынке Европейского Союза, выявили, что примерно одна пятая часть этих продуктов не содержит розавин, один из основных компонентов родиолы розовой.

Предлагаемые методологические подходы заключались в изменении целевых соединений, для которых ведется расчет количественного содержания (не суммы гликозидов коричневого спирта в пересчете на розавин, а только розавина) и условий хроматографического разделения (режим элюирования, длина волны и др.).

На предварительном этапе из корневищ с корнями родиолы розовой с использованием жидкостной колоночной хроматографии на силикагеле и последующей перекристаллизации из 95 % этанола был получен образец розавина, соответствующий требованиям к ГСО «Розавин» (ФС 42-0071-01). Фракции, содержащие салидрозид, были очищены путем рехроматографии на полиамиде с последующей перекристаллизацией салидрозида из смеси хлороформа и 95 % этилового спирта. Степень чистоты салидрозида по данным ТСХ, УФ-, ЯМР-спектроскопии и т.пл. (162-164 °С) составила не менее 98,0 %.

ВЭЖХ-анализ осуществляли с использованием хроматографа «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») в изократическом режиме элюирования (подвижная фаза – ацетонитрил : 1% раствор уксусной кислоты в воде в соотношении 14:86, скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента - 2500 мкл). Детекцию веществ осуществляли при длине волны 252 нм (розавин) и 278 нм (салидрозид) (рис. 9, 10).

Зависимость высоты и площади хроматографического пика от концентрации салидрозида описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 0,15 до 1,47 мг/мл, однако коэффициент корреляции для зависимости высоты пика от концентрации салидрозида составил 0,9996, для зависимости площади пика от концентрации – 0,9888. В связи с этим расчет содержания салидрозида в испытуемых образцах проводили с использованием высоты пика. Для зависимости высоты и площади пика от концентрации розавина в диапазоне концентраций от

¹ ФС.2.5.0036.15 «Родиолы розовой корневища и корни»

² ФС.3.4.0008.18 «Родиолы розовой корневищ и корней экстракт жидкий».

0,1200 до 0,9600 мг/мл коэффициенты корреляции составили 0,9973 и 0,9999. Поэтому определение содержания розавина проводили с использованием площади пика.

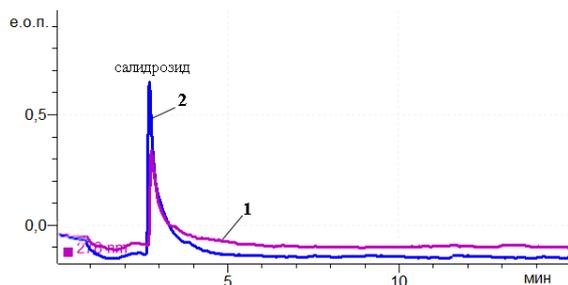


Рисунок 9. ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из ЛРС родиолы розовой (1) и после добавления раствора СО салидрозида (2) (детекция при длине волны 278 нм)

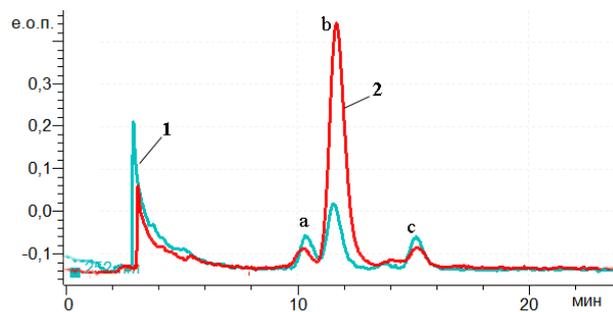


Рисунок 10. ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из ЛРС родиолы розовой (1) и после добавления раствора СО розавина (2) (детекция при длине волны 252 нм)
Обозначения: *a* – розарин; *b* – розавин; *c* – розин.

Метрологические характеристики предлагаемой ВЭЖХ-методики свидетельствуют о том, что ошибка определения среднего результата содержания салидрозида в корневищах и корнях родиолы розовой с доверительной вероятностью 95 % составляет $\pm 4,72$ %, розавина – $\pm 4,41$ %. Средний процент восстановления составил 99,1 % и 100,4 % соответственно. Ошибки определения салидрозида и розавина в пробах с добавками СО находились в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки.

В исследуемых образцах ЛРС родиолы розовой содержание розавина варьировало от $1,17 \% \pm 0,04$ % до $1,41 \% \pm 0,06$ %, салидрозида - от $1,63 \% \pm 0,05$ % до $2,88 \% \pm 0,12$ %. В образце, заготовленном в 2020 г., розавин не обнаруживался, хотя другие гликозиды коричневого спирта присутствовали, что свидетельствует о неправильных условиях хранения сырья.

В аналогичных хроматографических условиях проанализированы промышленные образцы жидких экстрактов из корневищ и корней родиолы розовой. Ни в одном из 6 проверенных промышленных образцов розавин не обнаруживался, в отличие от экспериментальных образцов экстрактов, полученных в лабораторных условиях из сырья, содержащего эти компоненты по данным предварительных аналитических исследований. В проанализированных промышленных образцах содержание салидрозида варьировало от $0,96 \% \pm 0,04$ % до $2,75 \% \pm 0,08$ %. Содержание розавина в экспериментальных образцах жидких экстрактов составляло от $0,21 \% \pm 0,03$ % до $0,32 \% \pm 0,04$ % и салидрозида – от $2,13 \% \pm 0,05$ % до $2,71 \% \pm 0,12$ %.

4.2. Разработка подходов к стандартизации сырья и препаратов сирени обыкновенной

Несмотря на биологическую активность и значимость в качестве сырья для получения СО сирингина кора сирени обыкновенной не включена в ГФ РФ XIV издания. Оценка качества сырья сирени обыкновенной осуществляется в соответствии с временной фармакопейной статьей 42-2106-92 «Кора сирени обыкновенной», в которой предусмотрено хроматоспектрофотометрическое определение сирингина.

В связи с тем, что кора сирени обыкновенной является источником СО сирингина (элеутерозида В), нами предлагается ВЭЖХ-определение содержания этого соединения в сырье.

ВЭЖХ-анализ осуществляли с использованием хроматографа «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») в изократическом режиме элюирования (подвижная фаза – ацетонитрил : 1% раствор уксусной кислоты в воде в соотношении 15:85), скорость элюирования - 100 мкл/мин, объем элюента - 1500 мкл, объем вводимой пробы 1 мкл, детекция при длине волны 266 нм. Расчет содержания сирингина проводили методом внешнего стандарта.

Ошибка определения среднего результата содержания сирингина в коре сирени обыкновенной с доверительной вероятностью 95 % составляла +3,20 %. При оценке правильности средний процент восстановления составил 98,8 %. Определение линейности проводили на пяти уровнях концентраций растворов сирингина (с концентрациями в диапазоне от 0,34 до 0,51 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,99971. Этот диапазон можно рассматривать как аналитическую область методики.

При анализе в этих условиях изучено влияние различных параметров на эффективность экстракции сирингина из образцов коры сирени обыкновенной в зависимости от концентрации экстрагента, времени термической экстракции и соотношения «сырье : экстрагент». Определено, что оптимальными параметрами экстракции являются: однократное извлечение 70% этиловым спиртом на кипящей водяной бане в течение 60 минут при соотношении «сырье : экстрагент» - 1:30.

Содержание сирингина в проанализированных образцах ЛРС варьировало от 2,55% до 5,38%.

4.3. Разработка подходов к стандартизации сырья и препаратов элеутерококка колючего

Корневища и корни элеутерококка колючего содержат несколько классов БАС, в том числе фенилпропаноиды, лигнаны, кумарины, флавоноиды, тритерпеновые сапонины. При этом элеутерозид В (сирингин) и элеутерозиды D и E считаются наиболее активными компонентами. Обращает на себя внимание тот факт, что под элеутерозидами понимаются компоненты, выделяемым из корневищ и корней элеутерококка колючего, с разной химической структурой (фенилпропаноиды, кумарины, стеринны, моносахариды и др.).

В Европейской Фармакопее X издания стандартизация сырья элеутерококка колючего предусматривает качественный анализ сырья элеутерококка методом ТСХ в присутствии СО эскулина (кумарин) и каталпола (иридоид) и количественное

определение суммы элеутерозидов В и Е с использованием в качестве стандарта феруловой кислоты в градиентном режиме элюирования с детекцией при длине волны 220 нм. Обращает на себя внимание тот факт, что в данном случае анализ корневищ элеутерококка колючего осуществляется с использованием трех СО, не содержащихся в ЛРС. В Российской Федерации в действующей фармакопейной статье «Элеутерококка колючего корневища и корни» качественный анализ основных групп БАС включает методы ТСХ в присутствии СО элеутерозида В, качественные реакции и ВЭЖХ³. Для оценки подлинности жидкого экстракта из корневищ и корней элеутерококка используют методы ВЭЖХ, УФ-спектрофотометрии и качественные реакции⁴. Определение содержания элеутерозида В проводится методом ВЭЖХ в градиентном режиме элюирования с детекцией при длине волны 266 нм. Анализ суммы элеутерозидов проводят спектрофотометрическим методом. Методики определения суммы элеутерозидов в сырье и жидком экстракте имеют некоторые отличия по условиям пробоподготовки: для анализа жидкого экстракта введена дополнительная стадия очистки.

С учетом разнообразия структуры элеутерозидов, международного опыта стандартизации сырья и препаратов элеутерококка колючего, физико-химических свойства сиринагина (умеренная растворимость в 95 % этаноле) предполагается, что включение методики определения суммы элеутерозидов в фармакопейные статьи на сырье и препараты элеутерококка колючего нецелесообразно. Кроме этого, открытым остается вопрос об оптимальном экстрагенте для извлечения элеутерозида В (сиринагина) и суммы биологически активных фенилпропаноидов.

Сравнение спектров поглощения в УФ- и видимой области извлечения из ЛРС элеутерококка колючего и входящих в его состав соединений позволяет предположить значимый и, возможно, даже определяющий вклад в общий спектр поглощения кумаринов (в частности, изофраксидин-7-О-глюкозида) и коричных кислот (хлорогеновая кислота) (рис. 11, 12).

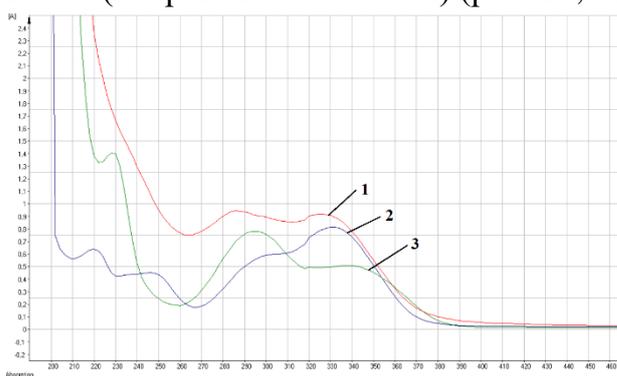


Рисунок 11. Спектры поглощения извлечения из корней и корневищ элеутерококка колючего (1), раствора хлорогеновой кислоты (2) и раствора изофраксидин-7-О-глюкозида (3)

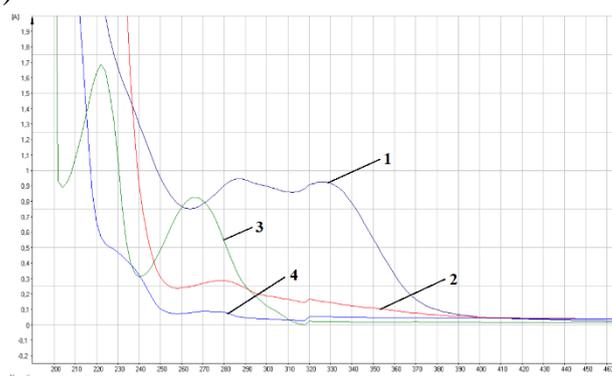


Рисунок 12. Спектры поглощения извлечения из ЛРС элеутерококка колючего (1), после очистки путем фильтрования через слой алюминия оксида (2), раствора СО сиринагина (3) и раствора элеутерозида D (4)

³ ФС.2.5.0053.15 «Элеутерококка колючего корневища и корни».

⁴ ФС.3.4.0009.18 «Элеутерококка колючего корневищ и корней экстракт жидкий».

После очистки суммарного извлечения из ЛРС элеутерококка колючего путем фильтрования через слой алюминия оксида значение максимума поглощения смещается в сторону максимумов поглощения элеутерозидов В и D (с 288 ± 2 нм до 280 ± 2 нм), увеличивается соотношение длины волны максимума поглощения и длины волны плеча, наблюдаемых в спектре исходного раствора ($A_{286}/A_{326} = 0,93 \pm 0,10$ в исходном извлечении и $1,44 \pm 0,18$ в извлечении после очистки) (рис. 12). С использованием СО синрингина показано, что он практически не удерживается оксидом алюминия.

С учетом указанных выше обстоятельств, представляется возможным определение суммы фенилпропаноидов методом прямой спектрофотометрии в пересчете на элеутерозид В (синрингин) после очистки путем фильтрования через слой алюминия оксида с регистрацией оптической плотности при длине волны, соответствующей максимуму поглощения элеутерозида В (266 нм). Расчет содержания проводится с использованием значения удельного показателя поглощения стандартного образца – 430 (ВФС 42-2088-92). Принципиально возможно определение суммы элеутерозидов в пересчете на элеутерозид D, имеющего более близкий максимум поглощения (272 нм), однако на текущий момент нет зарегистрированных СО этого соединения и применение СО синрингина можно считать более обоснованным в виду доступности сырьевого источника для его выделения – коры сирени обыкновенной.

Изучение влияния экстракционной способности различных водно-этанольных смесей показало, что наиболее оптимальным экстрагентом в отношении извлечения суммы фенилпропаноидов является 40 % этанол.

Метрологические характеристики спектрофотометрической методики определения суммы фенилпропаноидов в пересчете на элеутерозид В (с очисткой через слой алюминия оксида) свидетельствуют о том, что относительная ошибка среднего результата количественного определения в корневищах и корнях элеутерококка колючего с доверительной вероятностью 95 % составляет $\pm 4,20$ %.

Нами рассмотрена возможность количественного определения содержания синрингина в условиях, предложенных для коры и экспериментальных препаратов сирени обыкновенной. При разработке методики для обоснования экстрагента изучали эффективность экстракции элеутерозида В при использовании различных водно-спиртовых смесей. 40 % и 70 % этанол показали сопоставимую эффективность (t-критерий Стьюдента (расч.) = 3,20 > t-критерий Стьюдента = 2,13 ($f = 15$; $\alpha = 0,05$) в отношении извлечения элеутерозида В. С учетом того, что 40 % этанол показал более высокую эффективность для извлечения суммы фенилпропаноидов, он был выбран нами в качестве экстрагента для методики количественного определения, предусматривающей получение общего извлечения, используемого как для анализа содержания суммы фенилпропаноидов спектрофотометрическим методом, так и элеутерозида В методом ВЭЖХ.

Метрологические характеристики предлагаемой ВЭЖХ-методики свидетельствуют о том, что относительная ошибка определения среднего результата

содержания элеутерозида В в ЛРС элеутерококка колючего с доверительной вероятностью 95 % составляет $\pm 3,28$ %. Средний процент восстановления составил 98,3 %. Ошибки определения элеутерозида В в пробах с добавками СО находились в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки.

С использованием разработанных методик проанализировано несколько образцов сырья элеутерококка колючего. Определено, что содержание суммы фенилпропаноидов в корнях и корневищах элеутерококка колючего варьирует от $0,30 \% \pm 0,02 \%$ до $0,37 \% \pm 0,02 \%$, элеутерозида В - от $0,041 \% \pm 0,002 \%$ до $0,089 \% \pm 0,003 \%$.

5. Обоснование подходов к стандартизации ЛРС и ЛРП, содержащих флавоноиды и иные группы фенольных соединений

5.1. Обоснование подходов к стандартизации сырья и препаратов, содержащих флавоноиды

В соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации XIV издания флавоноиды анализируются в 40 % наименований ЛРС, в том числе в видах, формально не относящихся к группе флавоноидов. В настоящее время особую актуальность приобретают исследования, направленные на совершенствование методов анализа с использованием ТСХ, ВЭЖХ и соответствующих диагностически значимых СО.

В результате проведения исследований были подобраны условия для доочистки рабочих образцов рутина с недостаточной степенью чистоты, получения СО кверцетина из СО рутина и отработана технология получения дигидрокверцетина.

В качестве источника СО другого представителя класса флавоноидов – изосалипурпозиды - рассматривают цветки бессмертника песчаного, в связи с чем представляется целесообразным определение содержания именно этого соединения, и одним из возможных методов является ВЭЖХ. На текущий момент, согласно действующей ФС.2.5.0007.1 «Бессмертника песчаного цветки», стандартизация этого вида ЛРС осуществляется по содержанию суммы флавоноидов в пересчете на изосалипурпозид.

В рамках диссертационной работы проведены исследования по подбору условий для ВЭЖХ-анализа изосалипурпозиды и валидационная оценка ВЭЖХ-методики. Проанализировали образцы цветков бессмертника песчаного, собранные в различных регионах РФ, промышленные образцы сырья производства ОАО «Красногорсклексредства» и ООО ПКФ «Фитофарм».

Пробоподготовка заключалась в получении водно-спиртового извлечения из цветков бессмертника песчаного с использованием следующих параметров: экстракция в условиях кипения, экстрагент – 70 % этанол, время экстракции – 1 ч, соотношение «сырье – экстрагент» 1:50.

ВЭЖХ-анализ осуществляли в изократическом режиме элюирования (подвижная фаза – ацетонитрил : 1% раствор уксусной кислоты в воде в соотношении 25:75), аналитическая длина волны при разметке пиков – 360 нм.

Зависимость высоты хроматографического пика от концентрации изосалипурпоза описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 0,20 до 1,40 мг/мл. Этот диапазон можно рассматривать как аналитическую область методики. Коэффициент корреляции составил 0,9964. Степень восстановления изосалипурпоза составила в среднем 97,8 %, что подтверждает правильность методики. Относительная ошибка среднего результата определения содержания халкона в цветках бессмертника песчаного с доверительной вероятностью 95 % составляет $\pm 4,12$ %.

С использованием разработанной методики были проанализировано содержание изосалипурпоза в нескольких образцах сырья бессмертника песчаного, во всех образцах его содержание превышало 1,0 %.

Следовательно, целесообразным является включение методики количественного определения изосалипурпоза методом ВЭЖХ в фармакопейную статью на сырье «Бессмертника песчаного цветки», а также введение нового числового показателя «Содержание изосалипурпоза не менее 1,0 %). ВЭЖХ-хроматограмма испытуемого раствора может быть также использована для целей идентификации цветков бессмертника песчаного.

5.2. Обоснование подходов к стандартизации сырья и препаратов, содержащих иные группы фенольных соединений

Особый интерес в плане усовершенствования подходов к стандартизации представляет ЛРС, содержащее отдельно выделенную группу БАС – антраценпроизводные. Нами представлена актуализация требований к качеству ЛРС, содержащих антраценпроизводные, на примере свежих листьев алоэ древовидного и препаратов на их основе.

Стандартизацию видов алоэ в Британской, Японской, Европейской Фармакопеех и Фармакопее США проводят по содержанию барбалоина (алоина А) спектрофотометрическим методом. В Российской Федерации в представленных на сайте Министерства здравоохранения проектах фармакопейных статей «Алоэ древовидного листа свежие» и «Алоэ древовидного листа» (взамен ФС 42-2191-84 и ФС 42-2800-91 соответственно) количественное определение также предусмотрено проводить спектрофотометрическим методом с пересчетом содержания суммы антраценпроизводных на алоэ-эмодин. Все описанные в литературе методики многостадийны, предусматривают предварительный кислотный гидролиз в сочетании с окислением, жидкость-жидкостную экстракцию образовавшихся агликонов и последующее комплексообразование с магния ацетатом. В то же время имеются литературные данные, что доминирующим и более стабильным соединением листьев алоэ древовидного является алоэнин (4-метокси-6-(2'-β-D-глюкопиранозил-4'-гидрокси-6'-метилфенил)-2-пирон).

В рамках выполнения диссертационной работы проведены исследования по совершенствованию методик количественного определения суммы антраценпроизводных в пересчете на барбалоин, а также разработка и валидация методики количественного определения алоэнина с использованием метода ВЭЖХ в изократическом режиме элюирования в сырье и препаратах алоэ древовидного.

На предварительном этапе из свежих листьев алоэ древовидного с использованием колоночной хроматографии на силикагеле, полиамиде и различных элюентных смесей были выделены доминирующие вещества, идентифицированные методами УФ-, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии как барбалоин, известный как смесь изомеров алоина А и алоина В, и алоэнин, которые далее использовались в качестве рабочих СО при разработке методик.

При изучении электронных спектров сока, водно-спиртовых извлечений листьев алоэ древовидного обнаружен вклад в кривую поглощения алоэнина в области 300–310 нм и барбалоина в области 290–310 нм и 350–390 нм (рис. 13). Вклад антраценпроизводных в спектр ЛРС и ЛРП алоэ древовидного подтверждается батохромным сдвигом длинноволновой полосы в щелочно-аммиачной среде, а также данными дифференциальных спектров с максимумом поглощения 412–416 нм (рис. 14, 15). При этом важно отметить, что в случае алоэнина не наблюдается батохромный сдвиг длинноволновой полосы в щелочно-аммиачной среде, что свидетельствует о возможности определения суммы антраценпроизводных в присутствии данного вещества, несмотря на его относительно высокое содержание.

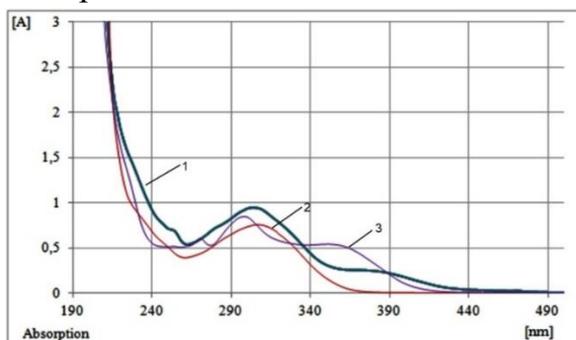


Рисунок 13. Спектры поглощения водно-спиртового извлечения из свежих листьев алоэ древовидного и выделенных из листьев алоэ соединений: 1 – водно-спиртовое извлечение из свежих листьев алоэ древовидного, 2 – 0,003% раствор барбалоина, 3 – 0,003% раствор алоэнина

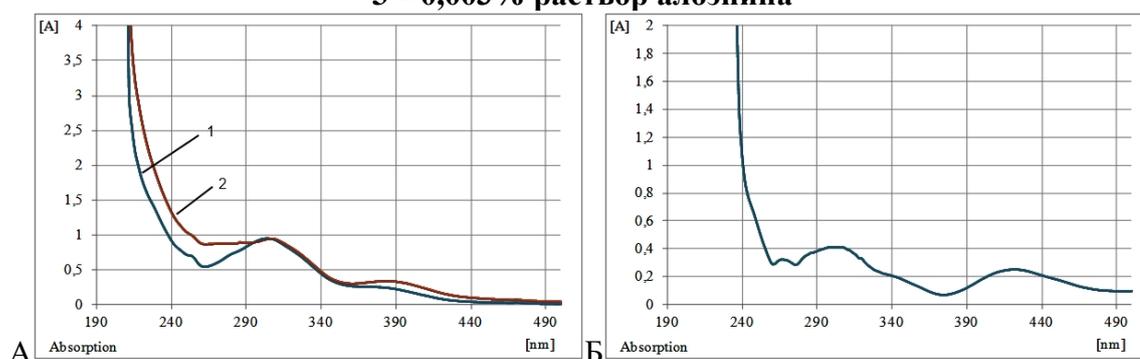


Рисунок 14. Спектры поглощения водно-спиртового извлечения из свежих листьев алоэ древовидного

Обозначения: А. Прямая спектрофотометрия: 1 – водно-спиртовое извлечение из свежих листьев алоэ древовидного, 2 – водно-спиртовое извлечение в щелочно-аммиачной среде; Б. Дифференциальный вариант

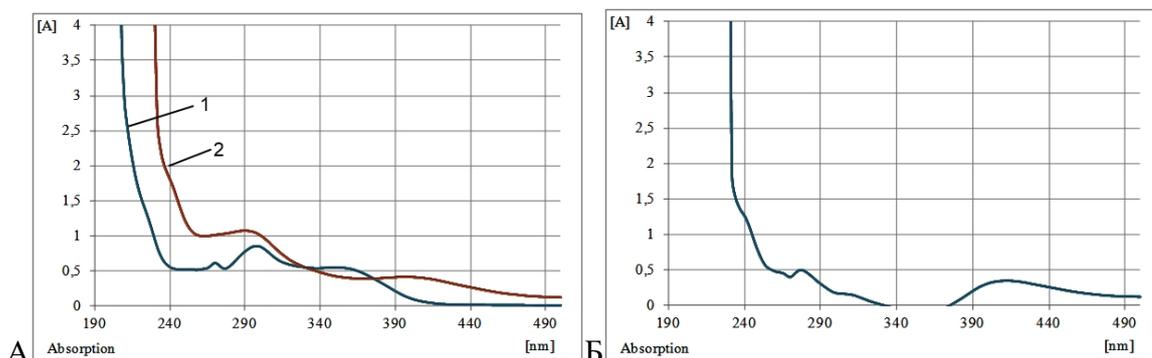


Рисунок 15. Спектры поглощения 0,003% раствора барбалоина

Обозначения: А. Прямая спектрофотометрия: 1 – 0,003% раствор барбалоина, 2 – 0,003% раствор барбалоина в щелочно-аммиачной среде, 2 – водно-спиртовое извлечение в щелочно-аммиачной среде; Б. Дифференциальный вариант

С учетом того, что антраценпроизводные и, в частности, барбалоин, являются БАС и вносят вклад в кривую поглощения, а также принимая во внимание тот факт, что максимумы поглощения раствора барбалоина (смесь алоина А и алоина В), приготовленного *ex tempore* сока и водно-спиртового извлечения сырья алоэ древовидного, находятся в области 412 нм (дифференциальный вариант), целесообразным является определение содержания суммы антраценпроизводных в пересчете на барбалоин при длине волны 412 нм (рис. 14 и 15).

С использованием данного метода нами разработана методика количественного определения суммы антраценпроизводных в свежих листьях алоэ древовидного. Для этого сравнили экстракционную способность водно-этанольных смесей с различной концентрацией этанола, соотношения «сырье : экстрагент» и времени экстрагирования. Определено, что важными параметрами являются: 40% этанол, соотношение «сырье-экстрагент» – 1 : 50, время экстракции 60 мин.

Результаты статистической обработки проведенных опытов свидетельствуют о том, что ошибка среднего результата определения суммы антраценпроизводных в свежих листьях алоэ древовидного с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 3,36\%$.

Линейность методики определяли для серии растворов барбалоина (с концентрациями в диапазоне от 0,0157 до 0,0382 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,99995. Правильность методики определяли методом добавок путем добавления раствора выделенного вещества с известной концентрацией (25%, 50% и 75%) к испытуемому раствору. При этом средний процент восстановления составил 98%.

В соответствии с принципами унификации и гармонизации аналитических подходов для ЛРС и ЛРП на его основе разработанная для анализа сырья методика была адаптирована для анализа полученного *ex tempore* сока алоэ древовидного и лекарственных препаратов «Алоэ сок» (ЗАО «Вифитех»), «Алоэ экстракт жидкий»,

раствор для подкожного введения (ОАО «Дальхимфарм»; ЗАО «Вифитех»). Содержание суммы антраценпроизводных в пересчете на барбалоин составило $0,50 \pm 0,02\%$ в соке алоэ древовидного, $0,135 \pm 0,006\%$ в препарате «Алоэ сок» и $0,020 \pm 0,001\%$ в препаратах «Алоэ экстракт жидкий», раствор для подкожного введения.

ВЭЖХ-анализ содержания алоэнина осуществляли в условиях обращенно-фазовой хроматографии в изократическом режиме элюирования (подвижная фаза – ацетонитрил : 1% раствор уксусной кислоты в воде в соотношении 25:75, скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента - 2000 мкл). Детекцию веществ осуществляли при длине волны 306 нм.

Зависимость высоты хроматографического пика от концентрации алоэнина описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 0,12 до 1,40 мг/мл, предел количественного определения составил 0,11 мг/мл. Этот диапазон можно рассматривать как аналитическую область методики. Коэффициент корреляции составил 0,9995. Открываемость алоэнина составила 96,54-103,28 %, что подтверждает правильность методики. Относительная ошибка среднего результата определения содержания алоэнина в листьях алоэ древовидного с доверительной вероятностью 95 % составляет $\pm 4,10\%$, единичного определения – 13,4%.

С использованием аналитической методики проанализирована эффективность экстракции БАС для водно-этанольных смесей с различной концентрацией этанола (20 %, 40 %, 60%, 70 %, 80%, 95%). Установлено, что из исследованных концентраций оптимальными экстрагентами являются 40-70 % этанол.

Алоэнин являлся основным детектируемым соединением в полученном *ex tempore* соке из свежих листьев алоэ древовидного и препаратах «Алоэ сок» и «Алоэ экстракт жидкий, раствор для подкожного введения» (табл. 2).

Таблица 2. Содержание алоэнина в соке и препаратах алоэ древовидного

№ п/п	Образец	Содержание алоэнина (%)
1	Сок алоэ <i>ex tempore</i>	$3,22 \pm 0,35$
2	«Алоэ сок» (ЗАО «Вифитех»)	$0,210 \pm 0,008$
3	«Алоэ экстракт жидкий», раствор для подкожного введения (ЗАО «Вифитех»)	$0,071 \pm 0,001$
4	«Алоэ экстракт жидкий», раствор для подкожного введения (ОАО «Дальхимфарм»)	$0,079 \pm 0,002$

6. Исследование компонентного состава и обоснование целесообразности использования хромато-масс-спектрометрии для анализа ЛРС, содержащего эфирные масла

В рамках диссертационной работы рассмотрена возможность и целесообразность применения хромато-масс-спектрометрии для оценки подлинности некоторых эфиромасличных лекарственных растений.

Нами проведено изучение компонентного состава эфирных масел тимьяна ползучего, душицы обыкновенной, пижмы обыкновенной, липы сердцевидной, шалфея сухостепного, змееголовника молдавского, произрастающих на территории Самарской области.

Определено, что проанализированные образцы цветков пижмы обыкновенной по компонентному составу эфирного масла относятся к более распространенному хемотипу туйонового типа, образцы травы душицы обыкновенной – к хемотипу β -оцимен–гермакрин D– β -кариофиллен

Методом хромато-масс-спектрометрии изучен компонентный состав эфирных масел некоторых представленных в европейской части Российской Федерации растений (шалфея сухостепного, змееголовника молдавского) с целью оценки перспективности их использования в медицине.

В образцах эфирного масла змееголовника молдавского, возделываемого на территории Самарской области, основным компонентом является цитраль ($48,7 \pm 6,7\%$ от суммы площадей на хроматограмме компонентов эфирного масла (гераниаль ($29,5 \pm 4,8\%$) и нераль ($19,2 \pm 4,3\%$)). Основными компонентами эфирного масла травы шалфея сухостепного являются β -кариофиллен, сабинен, эликсен. Для преобладающих компонентов эфирных масел продемонстрирована высокая биологическая активность в экспериментальных исследованиях.

В связи с возможностью существования нескольких хемотипов в зависимости от компонентного состава эфирного масла для одного и того же ЛРС представляется актуальным изучение зависимости фармакологической активности, ассоциируемой с эфирными маслами, от их компонентного состава. При выявлении взаимосвязи хромато-масс-спектрометрия явилась бы необходимым инструментом для подтверждения качества ЛРС и возможности его дальнейшей переработки для получения фитопрепаратов.

Результаты сравнительных исследований при использовании разных методик пробоподготовки (получение эфирного масла методом перегонки с водяным паром, парофазный анализ, получение гексанового извлечения из спиртового экстракта из растительного сырья) показывают важность унификации методик пробоподготовки при оценке «фингерпринта» растительного сырья.

7. Разработка концепции системного подхода к стандартизации ЛРС и ЛРП, содержащих вещества ароматической и терпеноидной природы

На основании обобщения литературных данных и результатов экспериментальных исследований сформулирована концепция системного подхода к анализу ЛРС и ЛРП, содержащих БАС ароматической и терпеноидной природы, включающая:

- алгоритм выбора метода анализа ЛРС с учетом его целевого назначения, в котором учитывается дальнейшее использование ЛРС (для выделения индивидуальных веществ, суммы БАС, экстракционных монопрепаратов или комбинированных препаратов; отдельно выделена группа ЛРС, применяемых для получения эфирных масел) (рис. 16);

- алгоритм разработки методики количественного определения БАС с учетом их физико-химических характеристик (рис. 17);
- принципы системного подхода к анализу ЛРС и ЛРП (рис. 18).

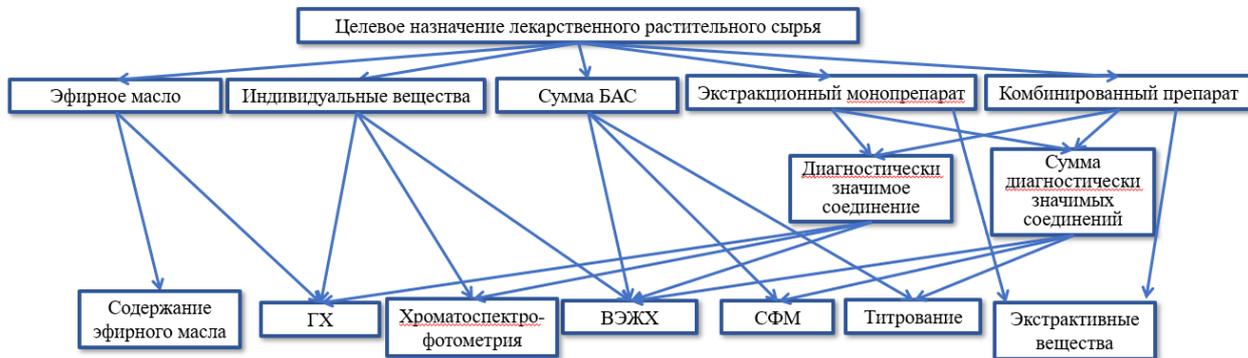


Рисунок 16. Алгоритм выбора метода анализа ЛРС с учетом его целевого назначения

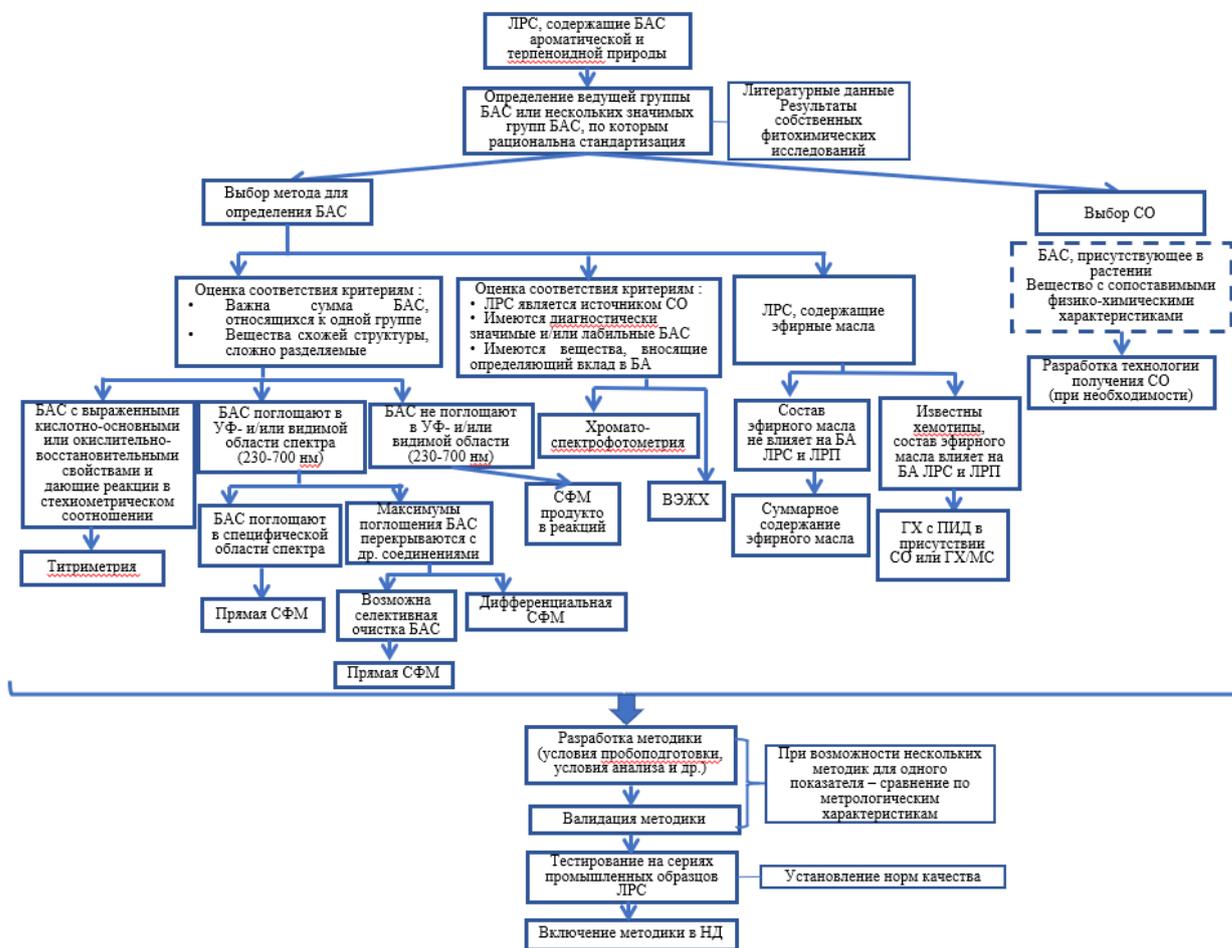


Рисунок 17. Алгоритм разработки методики количественного анализа действующих веществ в ЛРС, содержащем БАС ароматической и терпеноидной природы

Сокращения: БА – биологическая активность, БАС – биологически активное соединение, ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография, ГХ – газовая хроматография, ГХ/МС – газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектором, ПИД – пламенно-ионизационный детектор, СО – стандартный образец, СФМ – спектрофотометрия.



Рисунок 18. Принципы системного подхода к анализу ЛРС и ЛРП

Эта концепция использована для разработки способов получения и методов анализа ЛРП с использованием предлагаемых методологических подходов.

Разработаны способы получения следующих ЛРП: «Толокнянки сироп», «Брусники сироп», «Аралии сироп» (из настойки), «Сироп из суммы аммонийных солей аралозидов», «Сирени настойка», «Элеутерококка сироп», «Крушины сироп», «Жостера сироп», «Сенны сироп». Разработаны методики количественного определения БАС в экспериментальных ЛРП с соблюдением принципа системного подхода.

Проведены экспериментальные исследования фармакологической активности препаратов и суммы аралозидов аралии маньчжурской препаратов и индивидуальных соединений и препаратов толокнянки обыкновенной, препаратов из ЛРС, содержащих антраценпроизводные.

Данные докинга позволяют предположить мультимодальность нейротропного механизма действия олеаноловой кислоты, основного метаболита аралозидов. Результаты докинга, исследований нейротропной активности на крысах и опубликованных данных свидетельствуют о наличии у сапонина антидепрессантной, анксиолитической и ноотропной активности.

Этиловый эфир *n*-дигалловой кислоты, выделенный из листьев толокнянки обыкновенной, в условиях *in vitro* продемонстрировал антибактериальную активность в отношении тестовых культур грамположительных бактерий *Bacillus cereus* и *Staphylococcus aureus*, грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*, которая сохранялась при разведении исходного раствора (1 мг/л) в 32, 16, 32 и 16 раз соответственно.

Установлена диуретическая активность для другого индивидуального компонента листьев толокнянки обыкновенной – 1,3,6-тригаллоилглюкозы. 1,3,6-тригаллоилглюкоза в дозе 10 мг/кг продемонстрировала умеренную диуретическую и салуретическую активность в 4-х часовом эксперименте и выраженную диуретическую, салуретическую и креатининуретическую реакцию в 24-х часовом опыте, что возможно обусловлено высвобождением галловой кислоты в организме животных в процессе метаболических процессов.

У арбутина в дозе 20 мг/кг выявлены умеренные диуретические и салуретические свойства только в 24-х часовом эксперименте, в малых дозах он проявлял лишь тенденцию к увеличению показателей экскреторной функции почек. Отвар листьев толокнянки в дозе 50 мкл/кг демонстрировал тенденцию к увеличению отдельных показателей экскреторной функции почек опытных крыс относительно водного контроля.

В ходе исследования подтверждено выраженное слабительное действие отваров и сиропов, полученных из коры крушины ломкой, плодов жостера слабительного и листьев сенны остролистной.

Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности проведения дальнейших разработок ЛРП для этих видов ЛРС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании вышеизложенных результатов сформулирована концепция системного подхода к анализу лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов, содержащих БАС ароматической и терпеноидной природы, включающая алгоритм выбора метода анализа ЛРС с учетом его целевого назначения, алгоритм разработки методики количественного определения БАС с учетом их физико-химических характеристик, принципы системного подхода к анализу ЛРС и ЛРП.

На этапе выбора метода анализа количественного содержания действующих веществ следует учитывать целевое назначение ЛРС, фармакотерапевтическую значимость компонентов, технологические особенности и стабильность БАС (имеются ли диагностически значимые лабильные БАС).

При выборе СО в фармакопейных методиках анализа следует использовать диагностически значимое вещество, присутствующее в растении, или вещество того же класса БАС с близкими физико-химическими характеристиками. Необходимость применения и количество наименований СО БАС, не присутствующих в растении, должно быть обосновано.

Для унификации требований к качеству и мониторинга влияния технологического процесса на эффективность экстракции и стабильность БАС разработанные для ЛРС подходы к оценке подлинности и количественному определению действующих веществ следует использовать для анализа полученных на его основе фармацевтических субстанций и ЛРП.

Следует отметить, что постоянное наращивание арсенала современных аналитических методов не во всех случаях приводит к росту эффективности, доказательности исследований в рутинной аналитической практике, и в каждом случае должно быть обоснована концептуальная целесообразность использования предлагаемых подходов, а также результатами статистической обработки данных и метрологической оценкой методик анализа.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. В результате обзора литературных данных выявлено, что ЛП растительного происхождения остаются востребованными на фармацевтическом рынке. Одними из

проблем при разработке ЛП растительного происхождения является правильная идентификация ЛРС в процессе заготовки и при приемке на фармацевтических предприятиях. Решение этой проблемы заключается в комбинации физических, физико-химических, химических и биологических методов анализа (морфолого-анатомические исследования, спектроскопия, хроматография, генетические исследования и т.д.). Сравнение методов, используемых для анализа ЛРС и ЛРП на их основе показывает, что актуальной проблемой остается необходимость разработки системного подхода к стандартизации лекарственных средств растительного происхождения в ряду «сырье-фармацевтическая субстанция-препарат».

2. Научно обоснована методология выделения веществ из изучаемых видов ЛРС (листья толокнянки обыкновенной, корневища с корнями родиолы розовой, корни аралии маньчжурской, листья алоэ древовидного и др.). Из листьев толокнянки обыкновенной выделены арбутин (с чистотой не менее 98,0%), этиловый эфир *n*-дигалловой кислоты (впервые выделен из объектов природного происхождения), 1,3,6-тригаллоилглюкоза (впервые выделен из листьев толокнянки), галловая кислота, гиперозид. Показано, что для идентификации α -арбутина и β -арбутина принципиальное значение имеют данные ^1H -ЯМР-спектроскопии.

Из свежих листьев алоэ древовидного выделены смесь диастереоизомеров алоина А и алоина В (барбалоин) и алоэнин, идентифицированные на основании данных УФ-, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии.

Оптимизирован способ получения суммы сапонинов из корней аралии маньчжурской, который не уступает известному способу по выходу готового продукта, при этом количество стадий сокращено с 16 до 9 и исключено использование токсичных растворителей

3. Сформулирована концепция системного подхода к анализу ЛРС и ЛРП, содержащих БАС ароматической и терпеноидной природы, которая включает алгоритм выбора метода анализа ЛРС с учетом его целевого назначения, алгоритм разработки методики количественного определения БАС с учетом их физико-химических характеристик, а также принципы системного подхода к анализу ЛРС и ЛРП. В соответствии с разработанной концепцией обоснованы методологические подходы к анализу ЛРС и ЛРП: в случае корневищ и корней родиолы розовой более целесообразным является расчет содержания именно розавина, а не суммы гликозидов коричневого спирта в пересчете на розавин, который в наибольшей степени подвержен ферментативному расщеплению при нарушении условий сушки, хранения сырья и его переработки; для корневищ и корней элеутерококка колючего обоснована методика количественного определения суммы биологически активных фенилпропаноидов спектрофотометрическим методом.

4. С использованием метода ВЭЖХ (в изократическом режиме элюирования) разработаны и валидированы методики количественного определения глицирама и ликуразида в корнях солодки обыкновенной и препаратов на их основе, сиригина в

ЛРС и ЛРП сирени обыкновенной и элеутерококка колючего, розавина и салидрозида в ЛРС и ЛРП родиолы розовой, арбутина в ЛРС и ЛРП толокнянки обыкновенной и брусники обыкновенной, алоэина в ЛРС и ЛРП алоэ древовидного, изосалипурпозид в ЛРС и ЛРП бессмертника песчаного. Разработаны и валидированы методика количественного определения суммы антраценпроизводных методом дифференциальной спектрофотометрии (максимум поглощения при длине волны 412 нм) в пересчете на барбалоин в ЛРС и ЛРП алоэ древовидного.

Предложена методика определения суммы биологически активных фенилпропаноидов, которая заключается в получении водно-спиртового извлечения из корневищ и корней элеутерококка колючего (экстрагент – 40 % этанол), его очистке путем фильтрования через слой алюминия оксида с последующим спектрофотометрическим определением суммы фенилпропаноидов в пересчете на элеутерозид В (сирингин).

Разработана методика количественного определения суммы сапонинов аралии (аралозидов) в корнях аралии маньчжурской методом спектрофотометрии продуктов взаимодействия анализируемых веществ с концентрированной серной кислотой при аналитической длине волны 510 нм.

Научно обосновано использование в методиках качественного и количественного анализа СО сирингина (сирени обыкновенной кора, элеутерококка колючего корневища и корни), розавина и салидрозида (родиолы розовой корневища и корни), глицирама и ликуразида (солодки корни), суммы аммонийных солей аралозидов (аралии маньчжурской корни), арбутина (толокнянки обыкновенной листья, брусники обыкновенной листья), смеси алоинов А и В и алоэина (алоэ древовидного листья свежие).

5. В результате проведенных исследований разработаны схемы очистки рутина, кверцетина и дигидрокверцетина для достижения степени чистоты, требуемой для стандартных образцов. Для расширения ассортимента отечественных ЛП разработаны способы получения следующих ЛРП: «Толокнянки сироп», «Брусники сироп», «Аралии сироп» (из настойки), «Сироп из суммы аммонийных солей аралозидов», «Сирени настойка», «Элеутерококка сироп», «Крушины сироп», «Жостера сироп», «Сенны сироп».

6. В процессе исследования обоснована возможность определения содержания БАС в коммерчески доступных и экспериментальных ЛП различными методами (спектрофотометрия, ВЭЖХ) с соблюдением принципа унификации методик анализа в ряду «сырье-фармацевтическая субстанция-препарат».

7. Научно обоснованы нижние пределы содержания некоторых анализируемых БАС в ЛРС фармакопейных растений (бессмертника песчаного цветки, элеутерококка корневища и корни и др.). Продемонстрирована перспективность применения хромато-масс-спектрометрии для оценки подлинности ЛРС и ЛРП, содержащих эфирные масла.

8. Проведены экспериментальные исследования нейротропной активности препаратов и суммы аралозидов аралии маньчжурской препаратов в условиях экспериментальной установки «открытое поле», антибактериальной и диуретической активности индивидуальных соединений и препаратов толокнянки обыкновенной, слабительного действия препаратов из ЛРС, содержащих антраценпроизводные. Результаты исследования свидетельствуют о целесообразности проведения дальнейших разработок ЛП для этих видов ЛРС.

9. Результаты докинга, наших исследований на крысах и опубликованных данных свидетельствуют о наличии у сапонинов аралии антидепрессантной, анксиолитической и ноотропной активности.

Этиловый эфир *n*-дигалловой кислоты, выделенный из листьев толокнянки обыкновенной, в условиях *in vitro* продемонстрировал антибактериальную активность в отношении тестовых культур грамположительных бактерий *Bacillus cereus* и *Staphylococcus aureus*, грамотрицательных бактерий *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*, которая сохранялась при разведении исходного раствора (1 мг/л) в 32, 16, 32 и 16 раз соответственно.

Отвар листьев толокнянки в изученной дозе 50 мкл/кг демонстрировал тенденцию к увеличению отдельных показателей экскреторной функции почек опытных крыс относительно водного контроля, в то время как для компонента листьев толокнянки обыкновенной – 1,3,6-тригаллоилглюкозы – установлено диуретическое действие. 1,3,6-тригаллоилглюкоза в дозе 10 мг/кг продемонстрировала умеренную диуретическую и салуретическую активность в 4-х часовом эксперименте и выраженную диуретическую, салуретическую и креатининуретическую реакцию в 24-х часовом опыте. У арбутина в дозе 20 мг/кг выявлены умеренные диуретические и салуретические свойства только в 24-х часовом эксперименте, в малых дозах он проявлял лишь тенденцию к увеличению показателей экскреторной функции почек.

В ходе исследования подтверждено выраженное слабительное действие отваров и сиропов, полученных из коры крушины ломкой, плодов жостера слабительного и листьев сенны остролистной.

10. В ходе выполнения диссертационного исследования разработаны методики анализа, а также показатели качества на исследуемые виды ЛРС, фитопрепараты и стандартные образцы («Алоэ древовидного листа свежие», «Солодки голой корни», «Родиолы розовой корневища и корни», «Сирени обыкновенной кора», «Толокнянки обыкновенной листья», «Брусники обыкновенной листья», «Аралии маньчжурской корни», «Салидрозид-стандартный образец», «Сирингин-стандартный образец», «Кверцетин-стандартный образец», «Рутин-стандартный образец», «Дигидрокверцетин-стандартный образец», «Сирингин-стандартный образец»), отражаемые в проектах фармакопейных статей, которые будут рекомендованы для включения в Государственную фармакопею РФ.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Предложенные методологические подходы к разработке методик стандартизации ЛРС и ЛРП, содержащих БАС ароматической и терпеноидной природы, с учетом их химического состава, целевого назначения и принципа гармонизации в ряду «лекарственное растительное сырье – фармацевтическая субстанция – лекарственный растительный препарат» могут быть реализованы с целью совершенствования фармакопейных методик качественного и количественного определения БАС с использованием физико-химических методов.

Результаты структурных исследований, исследований по выделению и очистке индивидуальных соединений создают методологическую основу для разработки технологии получения и обоснования показателей качества СО.

Продемонстрирована перспективность изучения зависимости фармакологической активности, ассоциируемой с эфирными маслами, от их компонентного состава. При выявлении взаимосвязи хромато-масс-спектрометрия явилась бы необходимым инструментом для подтверждения качества ЛРС и возможности его дальнейшей переработки для получения фитопрепаратов.

Перспективным направлением развития методологических принципов, представленных в диссертационной работе, является разработка критериев выбора метода и показателей качества комбинированных лекарственных растительных препаратов на примерах изложенных аналитических алгоритмов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Kurkin, V.A. Quantitative determination of total flavonoids in bilberry shoots / V.A. Kurkin, T.K. Ryazanova // **Pharmaceutical Chemistry Journal**. – 2013. - Vol. 47, No. 4. – P. 213.
2. Куркин, В.А. Количественное определение суммы антраценпроизводных в лекарственном препарате «Крушины сироп» / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, Т.К. Рязанова, А.Н. Саньков // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2014. – Т. 48, № 7. – С. 41-43.
3. Куркин, В.А. Определение суммы антраценпроизводных в препарате «Крушины экстракта таблетки» / В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, Т.К. Рязанова, А.Н. Саньков // **Фармация**. – 2015. - № 1.-10-12.
4. Куркин, В.А. Количественное определение арбутина в листьях толокнянки обыкновенной / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, И.А. Платонов, Л.В. Павлова // **Химия растительного сырья**. – 2015. - № 1. – С. 95-100.
5. Куркин, В.А. Количественное определение суммы антрахиноновых гликозидов в лекарственном препарате «Сенны сироп» // В.А. Куркин, А.А. Шмыгарева, Т.К. Рязанова, А.Н. Саньков // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2016. – Т. 50, № 10. – С. 47-50.
6. Борисов, М.Ю. Фитохимическое исследование корневищ куркумы длинной / М.Ю. Борисов, Е.В. Авдеева, В.А. Куркин, Т.К. Рязанова // **Сеченовский вестник**. – 2016. – № S1. – С. 41-43.
7. Куркин, В.А. Изучение химического состава корневищ куркумы длинной // В.А. Куркин, М.Ю. Борисов, Е.В. Авдеева, Т.К. Рязанова [и др.] // **Фармация**. – 2017. – Т. 66, № 2. – С. 28-32.
8. Куркин, В.А. Определение арбутина в листьях брусники обыкновенной / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, И.А. Платонов, Л.В. Павлова // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2017. – Т. 51, № 4. – С. 34-37.
9. Куркин, В.А. Антимикробная активность веществ листьев толокнянки обыкновенной / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, А.В. Жестков, А.В. Лямин [и др.] // **Химия растительного**

сырья. – 2018. – № 3. – С. 53-60.

10. Куркин, В.А. Количественное определение суммы сапонинов в сырье аралии маньчжурской / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2018. – Т. 52, № 5. – С. 42-45.

11. Куркин, В.А. Исследование компонентного состава эфирных масел тимьяна ползучего и душицы обыкновенной, произрастающих в Самарской области / В.А. Куркин, А.В. Куркина, А.И. Хусаинова, Т.К. Рязанова, О.В. Сазонова // **Медицинский вестник Башкортостана**. – 2018. – Т. 13, № 2 (74). – С. 44-47.

12. Куркин, В.А. Влияние индивидуальных соединений листьев толокнянки обыкновенной на выделительную функцию почек крыс / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, Е.Н. Зайцева, А.В. Дубищев // **Экспериментальная и клиническая фармакология**. – 2019. – Т. 82, № 1. – С. 11-15.

13. Куркин, В.А. Сравнительное исследование спектральных характеристик α -арбутина и β -арбутина / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, А.В. Куркина, С.В. Первушкин [и др.] // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2019. – Т. 22, № 10. – С. 10-18.

14. Куркин, В.А. Разработка подходов к стандартизации коры сирени обыкновенной / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, А.Д. Серебрякова // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2021. – Т. 24, № 7. – С. 37-44.

15. Куркин, В.А. Определение содержания алоэина в листьях и препаратах алоэ древовидного методом ВЭЖХ / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, А.А. Шмыгарева, С.Н. Глущенко // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2021. – Т. 55, № 5. – С. 13-18.

16. Куркин, В.А. Актуальные аспекты стандартизации корневищ и корней родиолы розовой / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2021. – Т. 55, № 8. – С. 40-44.

17. Куркин, В.А. Разработка методик количественного определения суммы антраценпроизводных в сырье и препаратах *Aloe arborescens* Mill. / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, А.А. Шмыгарева, С.Н. Глущенко // **Химия растительного сырья**. – 2021. – № 3. – С. 153-161.

18. Куркин, В.А. Вопросы стандартизации лекарственных препаратов родиолы розовой / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова // **Фармация и фармакология**. – 2021. – Т. 9, № 3. – С. 185-194.

19. Куркин, В.А. Вопросы количественного определения биологически активных соединений корней солодки / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, М.В. Егоров, О.А. Белова // **Фармация**. – 2021. – Т. 70, № 7. – С. 24-31.

20. Куркин, В.А. Методологические подходы к стандартизации корневищ и корней элеутерококка колючего / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2022. – Т. 56, № 3. – С. 34-41.

21. Куркин, В.А. Перспективы создания импортозамещающих нейротропных, иммуномодулирующих, антиоксидантных и гепатопротекторных фитопрепаратов / В.А. Куркин, А.В. Дубищев, Е.В. Авдеева, О.Л. Кулагин [и др.] // **Материалы научных трудов научно-практической конференции «Средства и методы традиционной китайской медицины в России»**. – М., 2011. – С. 23-24.

22. Куркин, В.А. Новые подходы к комплексному использованию плодов и побегов черники обыкновенной / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова // **Известия Самарского научного центра Российской Академии наук**. – 2012. – Т. 14, № 5 (3). – С. 757-761.

23. Куркина, А.В. Флавоноиды надземной части *Polygonum persicaria* / А.В. Куркина, В.А. Куркин, Т.К. Рязанова // **Химия природных соединений**. – 2013. – № 5. – С. 728-730.

24. Куркина, А.В. Флавоноиды надземной части *Polygonum hydropiper* / А.В. Куркина, В.А. Куркин, Т.К. Рязанова // **Химия природных соединений**. – 2013. – № 5. – С. 715-716.

25. Куркина, А.В. Состав и содержание флавоноидов в листьях *Ginkgo biloba* (*Ginkgoaceae*), культивируемого в различных регионах России / А.В. Куркина, Н.В.

- Загоскина, Т.К. Рязанова // Растительные ресурсы. – 2013. – Т. 49, № 3. – С. 410-415.
26. Куркин, В.А. Сравнительное хроматографическое исследование лекарственного растительного сырья толокнянки, брусники и черники / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова // **Вестник фармации**. – 2014. – № 2 (64). – С. 32-36.
27. Первушкин, С.В. Исследования по разработке лекарственного средства с антиоксидантным действием / С.В. Первушкин, В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, П.Г. Мизина [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2014. – Т. 16, № 5-2. – С. 1013-1017.
28. Куркин, В.А. Сравнительное морфолого-анатомическое исследование надземных органов черники обыкновенной, брусники обыкновенной и толокнянки обыкновенной / В.А. Куркин, В.М. Рыжов, Т.К. Рязанова, Л.В. Тарасенко // Известия Самарского научного центра Российской Академии наук. - 2015. - Т. 17, № 5 (3). – С. 964-971.
29. Рязанова, Т.К. Фитохимическое исследование и актуальные вопросы стандартизации корней аралии маньчжурской / Т.К. Рязанова, Л.В. Зулкарняева // Аспирантские чтения – 2015. Материалы научно-практической конференции с международным участием «Молодые учёные XXI века - от идеи к практике», посвященной 85-летию Клиник СамГМУ. Самара, 2015. – С. 167-168.
30. Варина, Н.Р. Исследование номенклатуры лекарственных средств для местного лечения инфекционно-воспалительных заболеваний полости рта и горла, представленных на фармацевтическом рынке РФ / Н.Р. Варина, В.А. Куркин, И.К. Петрухина, Е.В. Авдеева, Л.Д. Климова, Т.К. Рязанова // Медицинский альманах. – 2016. - № 5 (45). – С. 207-210.
31. Куркин, В.А. Актуальные аспекты стандартизации видов лекарственного растительного сырья, включенных в Государственную Фармакопею Российской Федерации XIII издания препаратов / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, А.В. Куркина, О.Е. Правдивцева [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2016. – Т. 18. № 2-3. – С. 730-736.
32. Куркин, В.А. Актуальные аспекты стандартизации лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, А.В. Куркина, О.Е. Правдивцева [и др.] // Современные проблемы фармакогнозии. Сборник материалов. ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России. – 2016. – С. 163-185.
33. Рязанова, Т.К. Разработка состава и методов стандартизации лекарственных препаратов на основе корней аралии маньчжурской / Т.К. Рязанова, Л.В. Зулкарняева // Аспирантские чтения - 2016: материалы научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые – от технологий XXI века к практическому здравоохранению». – Самара, 2016 – С. 228-229.
34. Хусаинова, А.И. Исследование цветков пижмы обыкновенной методом газовой хроматографии / А.И. Хусаинова, Т.К. Рязанова, Н.В. Ермакова // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. Приложение № 2 (сборник материалов 82-й Всероссийской итоговой молодежной научной конференции с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины»). – Уфа, 2017. – С. 854-864.
35. Рязанова, Т.К. Фармакогностическое исследование лекарственных растений с диуретической активностью / Т.К. Рязанова // Вестник Башкирского государственного медицинского университета. Приложение № 2 (сборник материалов 82-й Всероссийской итоговой молодежной научной конференции с международным участием «Вопросы теоретической и практической медицины»). – Уфа, 2017. – С. 767-773.
36. Куркин, В.А. Сравнительное исследование состава жирных кислот масла расторопши и подсолнечного масла / В.А. Куркин, Д.В. Росихин, Т.К. Рязанова // Медицинский альманах. - 2017. - №1(46). - С. 99-102.
37. Борисов, М.Ю. О перспективах разработки новых видов лекарственного растительного сырья на основе пищевых растений (на примере куркумы длинной) / М.Ю. Борисов, Т.К. Рязанова, Е.В. Авдеева, Н.Р. Варина // Современные аспекты использования

- растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине: V научно-практическая конференция, 15 марта 2017 года. – М., 2017. – С. 40-43.
38. Kurkin, V.A. Constituents of *Arctostaphylos uva-ursi* leaves / V.A. Kurkin, T.K. Ryzanova, E.D. Daeva, V.I. Kadentsev / **Chemistry of Natural Compounds**. – 2018. – Vol. 54, No. 2. – P. 278-280.
39. Хусаинова, А.И. Исследование компонентного состава эфирного масла некоторых представителей эфиромасличных растений Самарской области / А.И. Хусаинова, Т.К. Рязанова, А.В. Куркина // Современные проблемы фармакогнозии. Сборник материалов III Межвузовской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию Самарского государственного медицинского университета. Под редакцией В.А. Куркина. – 2018. – С. 119-123.
40. Хусаинова, А.И. Изучение компонентного состава эфирного масла листьев котовника лимонного (*Nepeta cataria* L. *citriodora*) / А.И. Хусаинова, Т.К. Рязанова // Аспирантские чтения-2018. Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Исследования молодых ученых в решении актуальных проблем медицинской науки и практики». – 2018. – С. 136-137.
41. Куркин, В.А. Идентификация и биологическая активность фенольных соединений листьев толокнянки обыкновенной [*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.] / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, А.В. Дубищев, Е.Н. Зайцева [и др.] // Фенольные соединения: свойства, активность, инновации Сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума. Ответственный редактор Н.В. Загоскина. – 2018. – С. 315-319.
42. Лапина, А.С. Изучение химического состава монарды дудчатой (*Monarda fistulosa* L.), культивируемой на территории Самарской области / А.С. Лапина, В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, Т.К. Рязанова [и др.] // Фенольные соединения: свойства, активность, инновации Сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума. – М., 2018. – С. 320-324.
43. Рязанова, Т.К. Перспективы разработки отечественных лекарственных препаратов на основе куркуминоидного комплекса корневищ куркумы длинной / Т.К. Рязанова, В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, Н. Гиварш, О.В. Сазонова // Фенольные соединения: свойства, активность, инновации. Сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума. – М., 2018. – С. 502-506.
44. Мубинов, А.Р. Изучение жирнокислотного состава масла чёрного тмина / А.Р. Мубинов, Т.К. Рязанова, В.А. Куркин, Е.В. Авдеева // II Международная научная конференция «Роль метаболомики в совершенствовании биотехнологических средств производства». – 2019. – С. 181-187.
45. Хусаинова, А.И. Исследование компонентного состава эфирного масла змееголовника молдавского, культивируемого в Самарской области / А.И. Хусаинова, Т.К. Рязанова, А.В. Куркина, В.А. Куркин, О.В. Сазонова // II Международная научная конференция «Роль метаболомики в совершенствовании биотехнологических средств производства». – 2019. – С. 97-102.
46. Куркин, В.А. Актуальные аспекты стандартизации листьев толокнянки обыкновенной (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.) / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова // II Международная научная конференция «Роль метаболомики в совершенствовании биотехнологических средств производства». – 2019. – С. 494-500.
47. Хусаинова, А.И. Изучение компонентного состава эфирного масла липы сердцевидной / А.И. Хусаинова, Т.К. Рязанова // Современные проблемы фармакогнозии. IV Межвузовская научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 100-летию Самарского государственного медицинского университета. Сборник материалов. Под редакцией В.А. Куркина. – Самара, 2019. – С. 152-156.
48. Куркин, В.А. Актуальные аспекты стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего антраценпроизводные / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, Т.К. Рязанова // Материалы международной научной конференции «От растения до лекарственного

препарата». – М., 2020. – С. 198-203.

49. Рязанова, Т.К. Стандартизация лекарственного растительного сырья в Российской Федерации и Европейском Союзе / Т.К. Рязанова // Материалы 72-й научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы современной медицины и фармации». Витебский государственный ордена "Дружбы народов" медицинский университет. – Витебск, 2020. – С. 680-683.

50. Мубинов, А.Р. Жирнокислотный профиль арганового масла как критерий подлинности и доброкачественности / А.Р. Мубинов, Е.В. Авдеева, В.А. Куркин, Т.К. Рязанова // Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения. Сборник научных трудов Международной научной конференции. – М., 2020. – С. 231-235.

51. Kurkin, V.A. Comparative research of fatty acid composition and volatile components of fatty oils from seeds of *Nigella sativa* and *Argania spinosa* / V.A. Kurkin, A.R. Mubinov, H.V. Avdeeva, T.K. Ryazanova // **Research Journal of Pharmacy and Technology**. – 2021. – Vol. 14, No. 3. – P. 1586-1590.

52. Куркин, В.А. Новые подходы к количественному определению антраценпроизводных в сырье и препаратах алоэ древовидного / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, А.А. Шмыгарева, С.Н. Глуценко // OlymPlus. Гуманитарная версия. – 2021. – № 1(12). – С. 107-109.

53. Куркин, В.А. Сравнительное исследование химического состава надземных органов сирени обыкновенной (*Syringa vulgaris* L.) / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, А.Д. Серебрякова // В сборнике: 90 лет - от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы. Сборник материалов юбилейной международной научной конференции. – М., 2021. – С. 237-244.

54. Куркин, В.А. Концептуальные аспекты стандартизации корневищ и корней родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.) / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова // В сборнике: 90 лет - от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы. Сборник материалов юбилейной международной научной конференции. – М., 2021. – С. 245-249.

55. Белова, О.А. ВЭЖХ-анализ глицирризиновой кислоты в корнях солодки / О.А. Белова, Т.К. Рязанова // Аспирантские чтения - 2021: молодые ученые - медицине. Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Под редакцией А.В. Колсанова и Г.П. Котельникова. – Самара, 2021. – С. 246-248.

56. Рязанова, Т.К. Разработка методики анализа суммы фенилпропаноидов в корневищах и корнях элеутерококка колючего / Т.К. Рязанова, В.А. Куркин // Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения. Сборник материалов IX Международная научная конференция молодых учёных. – М., 2021. – С. 258-265.

57. Куркин, В.А. Актуальные аспекты стандартизации сырья и препаратов родиолы розовой (*Rhodiola rosea* L.) / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова // Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы. Сборник материалов. Самарский государственный медицинский университет. – Самара, 2021. – С. 345-351.

58. Серебрякова, А.Д. Подходы к стандартизации сырья надземной части сирени обыкновенной (*Syringa vulgaris* L.) / А.Д. Серебрякова, В.А. Куркин, Т.К. Рязанова // Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы. Сборник материалов. Самарский государственный медицинский университет. – Самара, 2021. – С. 468-474.

59. Рязанова, Т.К. Усовершенствование подходов к количественному определению флавоноидов в некоторых видах лекарственного растительного сырья / Т.К. Рязанова, В.А. Куркин // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты. Сборник материалов XI Международного симпозиума. Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. – 2022. – С. 59.

Авторские свидетельства, патенты, дипломы

1. **Патент на изобретение №2557929** от 30.06.2015 г. «Сироп крушины ломкой» / В.А.

Куркин, А.А. Шмыгарева, Т.К. Рязанова [Электронный ресурс]: Роспатент. – Режим доступа:

<https://searchplatform.rospatent.gov.ru/media/National/RU/C1/2015/07/27/0002557929//document.pdf>.

2. **Патент на изобретение №2582276** от 30.03.2016 г. «Сироп из плодов жостера слабительного» / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, А.А. Шмыгарева, А.Н. Саньков [Электронный ресурс]: Роспатент. – Режим доступа:

https://searchplatform.rospatent.gov.ru/media/National/RU/C1/2016/04/20/0002582276//N_ID_1.pdf.

3. **Патент на изобретение №2582982** от 06.04.2016 г. «Сироп из листьев сенны остролистной» / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, А.А. Шмыгарева, А.Н. Саньков [Электронный ресурс]: Роспатент. – Режим доступа:

<https://searchplatform.rospatent.gov.ru/media/National/RU/C1/2016/04/27/0002582982//document.pdf>.

4. **Патент на изобретение №2591081** от 20.06.2016 г. «Способ получения суммы сапонинов из корней аралии маньчжурской» / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, А.В. Куркина, И.К. Петрухина [Электронный ресурс]: Роспатент. – Режим доступа:

https://searchplatform.rospatent.gov.ru/media/National/RU/C1/2016/07/10/0002591081//N_ID_1.pdf.

5. **Патент на изобретение №2650642** от 16.04.2018 г. «Антиоксидантное средство «Куркумы экстракт густой» / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, В.А. Катаев, Г.М. Латыпова, Т.К. Рязанова и др. [Электронный ресурс]: Роспатент. – Режим доступа:

<https://searchplatform.rospatent.gov.ru/media/National/RU/C1/2018/04/16/0002650642//document.pdf>

6. **Патент на изобретение №2660555** от 06.07.2018 г. «Сироп из смеси аммонийных солей аралозидов» / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, С.В. Первушкин, Л.В. Зулькарняева [Электронный ресурс]: Роспатент. – Режим доступа:

https://searchplatform.rospatent.gov.ru/media/National/RU/C1/2018/07/06/0002660555//N_ID_1.pdf

7. **Патент на изобретение №2665167** от 28.08.2018 г. «Способ получения вещества, обладающего антибактериальной и противогрибковой активностью» / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, А.В. Лямин, А.В. Жестков [Электронный ресурс]: Роспатент. – Режим доступа:

https://searchplatform.rospatent.gov.ru/media/National/RU/C1/2018/08/28/0002665167//N_ID_1.pdf.

8. **Патент на изобретение №2665163** от 28.08.2018 г. «Сироп из настойки аралии маньчжурской» / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, С.В. Первушкин, Е.Н. Зайцева [и др.] [Электронный ресурс]: Роспатент. – Режим доступа:

<https://searchplatform.rospatent.gov.ru/media/National/RU/C1/2018/08/28/0002665163//document.pdf>.

9. **Патент на изобретение №2671408** от 31.10.2018 г. «Способ получения вещества, обладающего диуретической активностью» / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, Е.Н. Зайцева, А.В. Дубищев [Электронный ресурс]: Роспатент. – Режим доступа:

<https://searchplatform.rospatent.gov.ru/media/National/RU/C1/2018/10/31/0002671408//document.pdf>.