

БЕЛОВА ОЛЬГА АЛЕКСАНДРОВНА

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ КОРНЕЙ И ТРАВЫ
СОЛОДКИ ГОЛОЙ (*GLYCYRRHIZA GLABRA* L.) И СОЛОДКИ УРАЛЬСКОЙ
(*GLYCYRRHIZA URALENSIS* FISH.)**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

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

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор **Куркин Владимир Александрович**

Официальные оппоненты:

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

Хасанова Светлана Рашитовна – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии и ботаники, профессор.

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

Защита состоится «_____» _____ 2024 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.061.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке по адресу: 443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171 и на сайте (<https://samsmu.ru/scientists/science/referats/2024/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «_____» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук, доцент

Жданова Алина Валитовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В Российской Федерации (РФ) утверждена «Стратегия развития фармацевтической промышленности в Российской Федерации на период до 2030 года», определяющая развитие фармацевтической отрасли. Разработка безопасных и эффективных лекарственных препаратов (ЛП) – одно из основных приоритетных направлений для фармацевтической индустрии и промышленного сектора экономики РФ. В настоящее время внутренняя политика государства сосредоточена на сохранение технологического суверенитета в сфере производства лекарственных препаратов и медицинских изделий.

Фармакогнозия играет важную роль в развитии и формировании ассортимента лекарственных растительных средств (ЛРС). Согласно данным Государственного реестра лекарственных средств и литературных источников, количество ЛП растительного происхождения превышает около 4000 наименований (Государственный реестр лекарственных средств; Самылина И.А. и др., 2016; Киселева Т.Л. и др., 2013). Для расширения номенклатуры ЛРС выстраиваются такие приоритетные задачи, как: поиск значимых природных соединений, изучение химического состава новых видов ЛРС, а также расширение представлений о потенциале уже официального ЛРС, исследование показателей качества ЛРС и ЛП, усовершенствование и решение актуальных вопросов стандартизации ЛРС и ЛП, исследование способов получения и обоснование использования в лечебной практике (Куркин В.А., Авдеева Е.В. и др., 2016).

Диссертационная работа посвящена фармакопейным видам рода Солодка (*Glycyrrhiza* L.), а именно солодке голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодке уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.). Применение корней солодки данного растения в медицинской практике уже исторически обосновано и доказано исследованиями (Куркин В.А., 2014; Егоров М.В., 2005; В.А. Куркин, Т.К. Рязанова и др., 2021; Оленников Д.Н., Зилфикаров И.Н. и др., 2018; Бровченко Б.В., Ермакова В.А. и др., 2018). Однако надземная часть в РФ не используется в качестве источника ЛП. В ходе литературного обзора нами был выявлен интерес ряда зарубежных и отечественных ученых (Юлдашев М.П., Нигматуллаев А.М. и др., 2000; Миртурсунова И.М., Абдурахманов Б.А. и др., 2019; Siracusa L., Occhiuto C. et al., 2020; Molonia M.S., Occhiuto C. et al., 2018; Tundis R., 2019; Яницкая А.В., О.В. Недилько и др., 2020) к изучению химического состава травы солодки голой, в связи с содержащимися в них фенольных соединений флавоноидной природы, что свидетельствует об актуальности комплексной переработки данного растения.

Актуальным является и вопрос стандартизации корней солодки голой. Необходим пересмотр и доработка методов качественного и количественного анализа, отвечающих современным требованиям.

Степень разработанности темы. В медицинской практике Российской Федерации широко используются корни солодки (ГФ РФ XIV изд.), тогда как другие виды сырья данного растения не применяются.

Исследования химического состава надземной части (трава) солодки голой посвящены изучению флавоноидного состава. Основными ведущими флавоноидами являются пиноцембрин, глабринин, пурнетин (Юлдашев М.П., Нигматуллаев А.М. и др., 2000; Миртурсунова И.М., Абдурахманов Б.А. и др., 2019). Разработанные методики регламентируют количественное и качественное содержание суммы флавоноидов в траве солодки голой (Маматханова М.А., Абдурахманов Б.А. и др., 2016). Исходя из трудоемкости проведения пробоподготовки (многократной экстракции сырья 96% этиловым спиртом), дополнительных вспомогательных операций, в том числе упаривания и фильтрования, считаем актуальным проведение оптимизации методик анализа травы солодки голой.

Ранее зарубежными учеными установлена фармакологическая активность (гепатопротекторная, нейропротекторная, антибактериальная и др.) извлечения травы солодки голой, а также выделенных веществ из данного сырья (Юлдашев М.П., Нигматуллаев А.М. и др., 2000; Aiello F., Armentano B., 2017; Tundis R., 2019; Lee I. Y., Chang S.F., et al., 2022).

Следовательно, актуальным является изучение химического состава травы солодки голой и решение проблем стандартизации перспективного вида ЛРС – травы солодки голой.

Методики стандартизации, применяемые в анализе ЛРС и препаратов корней солодки, недостаточно обоснованы в плане особенностей химического состава корней солодки, следовательно, в недостаточной степени специфичны. В ГФ РФ XIV издания ФС.2.5.0040.15 «Солодки корни», в разделе «Подлинность» предусматривается определение кверцетина, однако данный флавоноид отсутствует в сырье. Диагностически значимым флавоноидом для корней солодки является ликуразид. В разделе «Количественное определение» рассматривается определение глицирризиновой кислоты в испытуемом сырье методом спектрофотометрии. Однако этот метод не учитывает возможность количественного определения диагностически значимого флавоноида (халкона) – ликуразида.

Цель работы и основные задачи исследования. Цель диссертационной работы заключается в проведении фармакогностического исследования корней и травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.) по научному обоснованию разработки и совершенствования методов стандартизации растительного сырья.

Для достижения поставленной цели решены следующие задачи:

1. Сравнительный морфологический анализ травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.), а также и других примесных видов рода Солодка (*Glycyrrhiza* L.), а также анатомо-гистологическое исследование травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.).
2. Выделение индивидуальных веществ из травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.), а также сравнительное изучение химического состава травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и других примесных видов рода Солодка (*Glycyrrhiza* L.).
3. Разработка методик качественного анализа травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.).
4. Разработка методик количественного анализа травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.).
5. Разработка способа получения стандартного образца пиноцембрина из травы солодки голой.
6. Изучение динамики накопления действующих веществ в зависимости от стадии вегетации травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.).
7. Разработка методик качественного и количественного определения БАС – глицирризиновая кислота и ликуразид в сырье корней солодки.
8. Изучение диуретической, нейропротективной активности густого экстракта из травы солодки голой, а также выделенных из данного вида сырья индивидуальных веществ – пиноцембрина, генистеина, изоглабранина.
9. Разработка проекта фармакопейных статей (ФС) на перспективный вид ЛРС «Солодки голой трава» и стандартного образца (СО) пиноцембрина.

Научная новизна. По результатам анатомо-гистологического исследования травы солодки голой позволило выявить впервые диагностические признаки, характерные для данного растения. В ходе изучения сравнительного морфологического анализа представителей рода *Glycyrrhiza* L., были выявлены особенные признаки травы солодки голой, позволяющие отличить от других примесных видов.

В процессе изучения химического состава травы солодки голой были выделены пиноцембрин (5,7-дигидроксифлаванон), генистеин (5,7,4'-тригидроксиизофлаванон), изоглабринин (5,7-дигидрокси-6-пренилфлаванон). Генистеин и изоглабринин ранее впервые выделены из травы данного растения. Пиноцембрин впервые выделен из травы солодки голой, культивируемой на территории Российской Федерации. Идентификация осуществлялась с использованием УФ-, ^1H -ЯМР- и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, а также масс-спектрометрии.

Впервые разработаны методики проведения ТСХ-анализа травы солодки голой, количественного анализа суммы флавоноидов в траве солодки голой в пересчете на пиноцембрин методом дифференциальной спектрофотометрии. Научно обоснована целесообразность определения содержания пиноцембрина в траве солодки голой методом ВЭЖХ.

Изучена динамика накопления суммы флавоноидов в траве солодки голой на протяжении всего вегетационного периода. Установлено, что оптимальное время сбора сырья данного растения является период плодоношения.

Обнаружена диуретическая и нейротропная активность густого экстракта солодки голой, а также индивидуальных веществ – пиноцембрина, генистеина. Проведено исследование острой токсичности густого экстракта травы солодки голой.

Разработаны проекты фармакопейных статей на ЛРС «Солодки голой трава» и стандартный образец (СО) пиноцембрина. Усовершенствована методика качественного анализа методом ТСХ с учетом химического состава. Также научно обосновано использование ГСО глицирама и СО ликуризида в методике количественного анализа методом ВЭЖХ корней солодки.

Патент Российской Федерации на изобретение № 2806047 «Способ количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой» – подтверждение научной новизны диссертационной работы.

Теоретическая и практическая значимость. В ходе исследования из травы солодки голой выделен и описан доминирующий, диагностически значимый флавоноид – пиноцембрин. Также были выделены ранее не описанные флавоноиды для данного растения: генистеин и изоглабринин. Разработаны методики качественного и количественного анализа БАС в траве солодки голой. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой (в пересчете на пиноцембрин) методом дифференциальной спектрофотометрии, а также методика количественного определения пиноцембрина с использованием метода ВЭЖХ.

Разработана технология получения стандартного образца пиноцембрина. Установлены предельные значения показателей качества СО пиноцембрина (ФС «Пиноцембрин – стандартный образец»).

Проведена исследовательская работа по совершенствованию методик качественного и количественного анализа ЛРС корня солодки с учетом химического состава.

Установлена диуретическая активность для выделенных веществ из травы солодки голой – пиноцембрина, генистеина. Густой экстракт травы солодки голой обладает антидепрессантом действием, что было определено в ходе фармакологического исследования.

Внедрение результатов исследования. Результаты исследовательской работы интегрированы в образовательные и научно-исследовательские процессы в Институте фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России: на кафедре фармацевтической технологии с курсом биотехнологий, кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, кафедре управления и экономики фармации – базовой кафедры «Аптеки Плюс», кафедре химии Института фармации, а также Научно-образовательного центра «Фармация».

Разработанные методики анализа травы солодки голой апробированы на предприятиях ЗАО «Самаралектравы», ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области».

Личный вклад автора. Все результаты исследования, описанные в диссертационной работе, получены автором. По результатам анатомо-гистологического и сравнительного морфологического анализа установлены диагностические признаки сырья травы солодки голой. Проведено сравнительное фитохимическое исследование представителей рода Солодка. Выделены и идентифицированы 3 индивидуальных вещества из травы солодки голой – пиноцембрин, генистеин, изоглабранин.

Изучен химический состав травы солодки голой, выявлен диагностически значимый флавоноид – пиноцембрин. Разработаны методики качественного и количественного анализа БАС травы солодки, а именно: ТСХ-анализ, спектрофотометрическое определение суммы флавоноидов (в пересчете на пиноцембрин). Научно обоснована целесообразность определения содержания пиноцебрина в траве солодке голой методом ВЭЖХ.

Проведена работа по разработке технологии получения стандартного образца пиноцебрина. Изучения динамика накопления флавоноидов в траве солодке голой в период вегетации.

Усовершенствованы методики качественного анализа ликуразида и глицирризиновой кислоты, разработана методика количественного определения методом ВЭЖХ БАС в корнях солодки с использованием ГСО глицирама и СО ликуразида

Изучена диуретическая и нейротропная активность густого экстракта травы солодки голой и индивидуальных веществ – пиноцебрина, генистеина, изоглабранина. Проведено исследование по острой токсичности густого экстракта.

Разработаны проекты ФС на новый вид ЛРС «Травы солодки голой» и СО пиноцебрина.

Связь задач исследования с планами научно-исследовательских работ. Исследовательская работа была осуществлена с учетом плана научно-исследовательских работ Самарского государственного медицинского университета, а именно в рамках выполнения темы НИОКР: «Химико-фармацевтические, биотехнологические, фармакологические и организационно-экономические исследования по разработке, анализу и применению фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов» (регистрационный номер: АААА-А19-119051490148-7, дата регистрации: 14.05.2019 г.)

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы базируется на углубленном и детальном изучении, а также систематизации литературных данных о фармакогностических исследованиях различных морфологических органов солодки голой и солодки уральской, а также и других примесных видов рода Солодка, оценке актуальности и степени разработанности выбранной темы исследования.

Была определена цель работы, сформулированы необходимые для ее выполнения задачи, а также составлен план выполнения диссертационного исследования, выбраны объекты и методы исследования.

Объектами данного исследования являлись трава и корни солодки голой и солодки уральской, собранные на территории Самарской области, Оренбургской области, Республики Казахстан, промышленные образцы корней солодки, а также примесные виды рода Солодка. Исследование проводилось с применением методов цифровой и люминесцентной микроскопии, тонкослойной хроматографии, УФ-спектрофотометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, колоночной хроматографии, масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии, цветных пробирочных и гистохимических реакций, фармакологических и микробиологических методов.

Статистическая обработка полученных данных осуществлялась в соответствии с ОФС.1.1.0013 «Статистическая обработка результатов физических, физико-химических и химических испытаний» ГФ РФ XV издания и ОФС.1.1.0014.15 «Статистическая обработка

результатов определения специфической фармакологической активности лекарственных средств биологическими методами» ГФ РФ XIV издания.

Степень достоверности научных положений основана на большом объеме экспериментального материала, полученного с использованием современных методов исследования, корректностью обработки информации, использованием актуальных и проверенных источников информации. Обработка результатов исследований проведена с использованием математических методов анализа данных в соответствии с ГФ РФ XV издания и ГФ РФ XIV издания.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Основные положения, описанные в диссертационном исследовании, соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) по следующим направлениям исследования:

2 – «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»;

3 – «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления»;

5 – «Изучение вопросов рационального использования ресурсов лекарственного растительного сырья с учетом влияния различных факторов на накопление биологически активных веществ в сырье»;

6 – «Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе».

Основные положения, выдвигаемые на защиту:

1. Результаты анатомо-гистологического исследования травы солодки голой.
2. Результаты сравнительного морфологического исследования травы солодки голой и солодки уральской, а также и других примесных видов рода Солодка.
3. Результаты исследования химического состава травы солодки голой, в том числе выделение и идентификация индивидуальных соединений.
4. Результаты сравнительного фитохимического исследования травы солодки голой и ее примесных видов.
5. Данные исследования по разработке подходов к качественному анализу травы солодки голой методом тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии.
6. Результаты разработки методики количественного содержания суммы флавоноидов в траве солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) в пересчете на пиноцембрин.
7. Результаты разработки методики количественного определения пиноцебрина в траве солодки голой методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.
8. Результаты качественного и количественного определения БАВ в ЛРС «Солодки корни».
9. Разработанные проекты фармакопейных статей «Солодки голой трава» и стандартного образца «Пиноцембрин – стандартный образец».

Публикации. По теме диссертационного исследования автором 11 печатных работ, 5 статей в журналах, включенных ВАК в перечень рецензируемых научных изданий, и 3 статьи в журналах, индексируемых в МБД. Получен 1 патент РФ на изобретение № 2806047.

Апробация работы. Основные материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на научных конференциях различных уровней: XI Международная научно-

практическая конференция молодых ученых «Современные тенденции развития технологий здоровье сбережения» (Москва, 2023); Научно-практическая конференция «Гаммермановские чтения» (Пермь, 2023); Международная научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Инновации в медицине и фармации 2021» (Минск, 2021); XI международный симпозиум «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2022); Всероссийской научно-практической онлайн-конференции с международным участием «Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы» (Самара, 2021, 2022, 2023); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Аспирантские чтения» (г. Самара, 2021; 2022, 2023).

Объем и структура работы. Общий объем диссертационной работы составляет 195 страниц машинописного текста, на которых изложены ход и результаты исследования. В диссертационной работе содержатся 33 таблицы и 66 рисунков. Работа включает в себя введение, обзор литературы, объекты и методы исследования, 5 глав, представляющих результаты исследования, вывод и заключение, список литературы, состоящий из 139 источников, из них 79 зарубежных, а также приложения.

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

Глава 1 представляет собой обзор литературы в области фармакогностических исследований солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.). В главе подробно рассматриваются ботаническое описание видов, химический состав, также данные о фармакологических свойствах корней и травы данных видов. Также приведена информация о стандартизации сырья, а также о методах количественного анализа корней солодки.

Глава 2 содержит описание объектов и методов исследования.

Глава 3 данного исследования посвящена результатам анатомо-гистологического исследования травы солодки голой. Кроме того, данная глава содержит сведения сравнительного морфологического анализа травы солодки голой, солодки уральской и примесных видов рода Солодка (*Glycyrrhiza* L.)

В **главе 4** приведены результаты выделения индивидуальных веществ из травы солодки голой. Они включают в себя данные о химическом строении и структуре выделенных соединений. Отражены результаты фитохимического анализа травы солодки голой, солодки уральской и примесных видов рода Солодка.

В **главе 5** рассматривается разработка методик качественного и количественного анализа травы солодки голой, а также разработке новой технологии получения СО пиноцембрина. Приведены результаты исследования динамики накопления суммы флавоноидов в траве солодки голой и рекомендуемые числовые показатели сырья, включенные в проект ФС на новый вид ЛРС «Солодки голой трава».

Глава 6 содержит результаты исследований по разработке методик качественного и количественного определения БАВ – ликуразида, глицирризиновой кислоты в корнях солодки.

В **главе 7** отражены результаты исследования диуретической и нейротропной активности густого экстракта травы солодки голой, а также индивидуальных веществ – пиноцембрина, генистеина, изоглабранина. Проведенные результаты острой токсичности густого экстракта травы солодки голой.

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

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектами диссертационного исследования служили образцы травы солодки голой и солодки уральской, собранные в период с 2015 по 2023 гг. на территории Оренбургской области (Сакмарский район, с. Татарская Каргала), Республики Казахстан (г. Державинск), Самарской области (Большечерниговский район, с. Большая Черниговка; Кинельский район, пгт. Алексеевка), Ботанического сада Самарского университета г. Самара; примесные виды рода Солодка – солодка зловонная, солодка щетинистая, собранные на территории Ботанического сада Самарского университета г. Самара в 2022 г.; Корни солодки, собранные на территории Ботанического сада Самарского университета г. Самара в 2018 г., промышленные образцы АО «Красногорсклексредства», БАД серия «Травы Алтая» ООО Алсу.

Исследованы также: густой экстракт травы солодки голой; индивидуальные вещества – пиноцембрин, генистеин, изоглабрин, ликвиритигенин, глицирам, глицирризиновая кислота, ликуразид, пиностробин.

Анатомо-гистологический анализ растительного сырья проводили с использованием цифровых микроскопов марки Motic DM-39C-N9GO ($\times 20$, $\times 40$), ZEISS Primo Star и люминесцентного микроскопа «Альтами» ЛЮМ-2 (голубой и желтый светофильтры) с увеличениями $\times 40$, $\times 100$, $\times 400$.

Изучение фитохимического состава травы солодки голой проводилось методом жидкостной адсорбционной хроматографии с использованием силикагеля марки КСК L 50/100 мкм (Россия), полиамида для колоночной хроматографии (Германия) и сефадекса LH-20 (Швеция). Идентификацию выделенных соединений проводили на основании данных ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР- и УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии. Спектральные характеристики выделенных веществ определяли путем регистрации ^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР спектров на приборе «JNM-ECX 400» (399,78 и 100,52 МГц, соответственно). Масс-спектры высокого разрешения были сняты на приборе «Bruker micrOTOF II» методом электрораспылительной ионизации (ESI). Регистрацию электронных спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena AG, Германия) в диапазоне длин волн 190–600 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм. На различные группы БАС проводились пробирочные реакции (с раствором железа (III) хлорида, раствором алюминия (III) хлорида, раствором диазобензолсульфокислоты, цианидиновая проба, цианидиновая проба по Брианту, реакция пенообразования, реакция Санье, реакция с реактивом Эрлиха, реакция Лафона). Для исследования извлечений из сырья и выделенных веществ методом ТСХ-анализа использовали пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» (Россия).

Для исследования извлечений изучаемых видов сырья и выделенных веществ использовали метод тонкослойной хроматографии с пластинками «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» (Россия). Спектрофотометрическое исследование проводили на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) в кюветах с толщиной слоя 10 мм в диапазоне длин волн от 190 нм до 700 нм. ВЭЖХ-анализ проводили с использованием хроматографа «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») с ультрафиолетовым детектором.

Густой экстракт из травы солодки голой получали с помощью 70% этилового спирта методом модифицированной дробной мацерации в течении 6 дней в соотношении «сырье-экстрагент» 1:5 с включением завершающей термической стадии при температуре 70 °С в течение 30 минут. Очистку вытяжки осуществляли методом отстаивания в температурном режиме не выше 10 °С в течении двух суток с последующей фильтрацией. Конечный продукт получали из жидкого экстракта путем упаривания под вакуумом при температуре 55 °С.

Определяли наличие диуретического и нейротропного действия густого экстракта солодки голой, а также выделенных из данного вида растительного сырья флавоноидов. Была исследована также острая токсичность густого экстракта.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Сравнительный морфологический анализ надземных частей видов рода Солодка

В ходе сравнительного морфологического анализа надземных частей видов рода Солодка было выявлено, что морфология плодовой части является значительно более весомым отличительным признаком, позволяющим селективно отличить примесные виды рода *Glycyrrhiza* L.

При осмотре внешних морфологических признаков были определены схожие признаки у некоторых видов: для солодки голой, солодки голой (подвид *grandulifera*) и солодки уральской отмечается идентичное строение соплодий, которые собраны густые плотные соплодия (рис. 1А, 1Б, 1Г). Строение соплодия солодки щетинистой весьма отличается от остальных изучаемых нами видов, форма шарообразная (головка), плоды собраны густо (рис. 1В). Семя всех видов характерно для семейства Бобовых.



Рисунок 1 – Внешний вид соплодий рода *Glycyrrhiza* L.: А – соплодие солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.); Б – соплодие солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L., подвид *grandulifera*); В – соплодие солодки щетинистой (*Glycyrrhiza echinata* L.); Г – соплодие солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.)

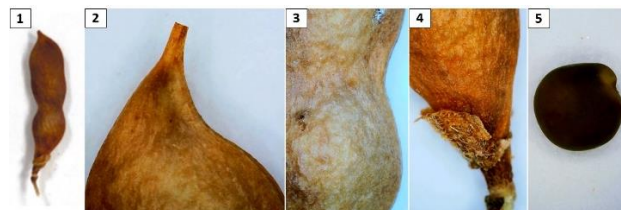


Рисунок 2 – Макрофотография плода солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.): 1 – плод (стручок); 2 – верхушка стручка; 3 – поверхность стручка; 4 – основание стручка; 5 – семя.

Диагностически значимым признаком для плодов солодки голой являются: плод прямой слегка извилистый (рис. 2.1); поверхность голая без опушения (рис. 2.3)

Исходя из проведенного сравнительного морфологического анализа нами был сделан вывод. Диагностически значимым признаком для листочков солодки голой являются: верхняя и нижняя поверхности усажены точечными железкам, клейкими от обильных выделений (рис. 3 А-2, рис. 3 Б-2); центральная жилка с нижней стороны листочка густо опушена (рис. 3 Б-3); поверхность черешка густоопушенная и скудно-железистая см (рис. 3 А-4, рис. 3 Б-4).

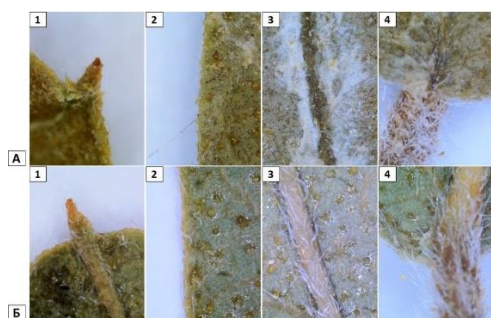


Рисунок 3 – Макрофотография листочка солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.):

А – верхняя сторона листочка; Б – нижняя сторона листочка: 1 – верхушка листочка; 2 – край листочка; 3 – центральная жилка; 4 – основание листочка.

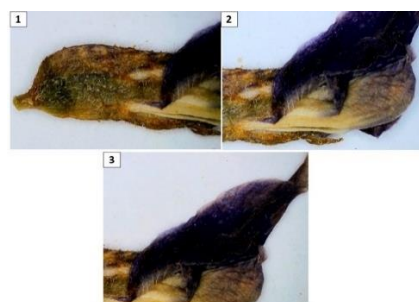


Рисунок 4 – Макрофотография цветка солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.): 1 – чашечка; 2 – венчик (крыло); 3 – венчик (парус).

Диагностически значимым признаком для цветков солодки голой являются: три фиолетовых крыла (рис. 4.2), два сросшихся зеленоватых паруса с фиолетовым оттенком, вдвое короче, чем крыло. Парус ярко выражен морфологически (рис. 4.3).

Наличие цветков в сырье, будет признаком недоброкачественного сырья, собранного не в ту фазу вегетации.

2. Морфолого-анатомическое исследование травы солодки голой

Отличительной чертой солодки голой является ромбообразная форма поперечного сечения рахиса в медиальной части с V-образной выемкой с адаксиальной стороны (рис. 5).

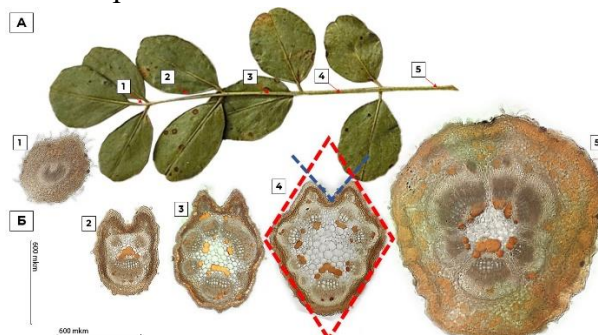


Рисунок 5 – Топография поперечных сечений рахиса листа солодки голой: А – фрагмент гербарного листа с рахисом; Б – поперечные сечения рахиса: 1 – черешочек листочка; 2, 3, 4 – промежуточные сегменты рахиса ; 5 – базальная часть рахиса.

Вся поверхность растения покрыта двумя типами трихом (рис. 6А). Первый тип трихом – железки, обильно покрывающие листовую пластинку и стебель (рис. 6Б). Они имеют крупную желто-коричневую головку, видимую на поверхности при помощи лупы x10. Головка мелкоклеточная с липофильным содержимым в протопластах клеток, что заметно по розовому окрашиванию при обработке раствором Судана III (рис. 6В).

Второй тип – кроющие бичевидные волоски, имеющие многоклеточное основание, сложенное из мелких клеток с заметно утолщенной лигнифицированной клеточной стенкой и длинной конечной клеткой с целлюлозной клеточной оболочкой (рис. 6Г, 6Д).

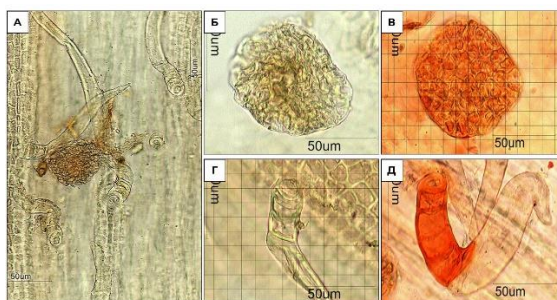


Рисунок 6 – Особенности строения эпидермиса стебля солодки голой: А – эпидермис верхней стороны (x400); Б – многоклеточная железка (x400); В – окраска многоклеточной железки раствором Судана III (x400); Г – бичевидный волосок (x400); Д – окраска бичевидного волоска раствором Судана III (x400).



Рисунок 7 – Эпидермис стебля солодки голой: А – пигментированные клетки (x400); Б – окраска раствором сернокислого анилина пигментированных клеток (x400).

Необходимо отметить, что данный тип трихом является типичным для многих представителей семейства *Fabaceae* таких, как донник лекарственный (*Melilotus officinalis* L.), что делает этот признак менее значимым для видовой специфичности.

Описанные ранее для листьев и стеблей признаки, пигментированные клетки с бурым содержимым протопласта, реагируют на раствор NaOH с резким потемнением окраски. Кроме того, с раствором сернокислого анилина аморфный пигмент окрашивается в тёмно-бурый цвет, иногда до черного в зависимости от концентрации реагента (рис. 7). Характер окраски пигмента, реагирующего на сернокислый анилин, позволяет предполагать, что основным компонентом протопласта являются сапонины тритерпенового ряда.

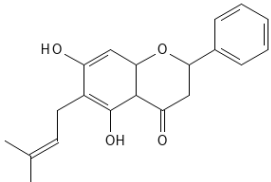
3. Исследование химического состава травы солодки голой

В ходе исследования состава травы солодки голой методом адсорбционной жидкостной хроматографии впервые выделены и идентифицированы генистеин (5,7,4'-тригидргидроксиизофлаванон), изоглабринин (5,7-дигидргидрокси-6-пренилфлаванон). Впервые на территории РФ из травы солодки голой был выделен доминирующий и диагностически значимый флавоноид пиноцембрин (5,7 – дигидроксифлаванон).

Выделенные из травы солодки голой и идентифицированные вещества флавоноидной природы представлены в табл. 1.

Таблица 1 – Характеристика веществ, выделенных из травы солодки голой

№ п/п	Название соединения, брутто формула	Структурная формула	Физико-химические характеристики
1.	Пиноцембрин (5,7-дигидргидроксифлаванон) $C_{15}H_{12}O_4$		Кристаллы белого цвета состава, т. пл. 193-195 °С (из смеси хлороформ- <i>n</i> -гексан). λ_{max} EtOH 290, 325 (пл.) нм
2.	Генистеин (5,7,4'-тригидргидроксиизофлаванон) $C_{15}H_{10}O_5$		Кристаллы светло-желтого цвета состава, т. пл. 296-298 °С (из смеси хлороформ-

			этанол). $\lambda_{\max}$ EtOH 280 нм
3.	Изоглабринин (5,7-дигидргидроксиф-6-пренилфлаванон) $C_{20}H_{20}O_4$		Кристаллы белого цвета состава т. пл. 193-195 °С (из смеси хлороформ- <i>n</i> -гексан). $\lambda_{\max}$ EtOH 290, 325 (пл.) нм

4. Сравнительный ТСХ-анализ надземных органов рода Солодка (*Glycyrrhiza* L.)

В ходе исследования были обнаружены несколько характерных хроматографических особенностей пяти видов надземной части рода Солодка (рис. 8). В качестве веществ свидетелей использовали спиртовые растворы выделенных веществ из травы солодки голой – пиноцембрин, генистеин, изоглабринин.

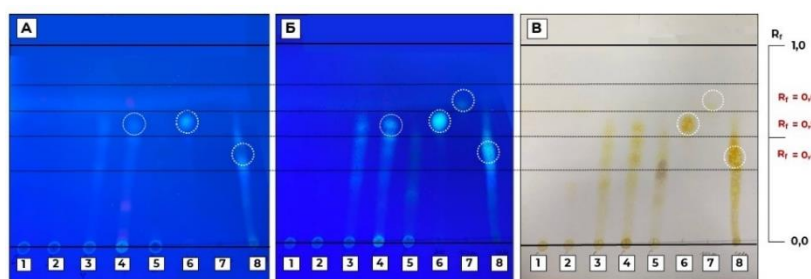


Рисунок 8 – Хроматограммы 70% водно-спиртовых извлечений надземных частей пяти видов рода Солодка в системе растворителей хлороформ-этанол (16:1): А – в УФ-свете $\lambda=365$ нм; Б – в УФ-свете $\lambda=365$ нм (после обработки спиртовым раствором $AlCl_3$); В – в видимом свете (после обработки ДСК).

Обозначения: 1 – Солодка щетинистая (*Glycyrrhiza echinata* L.); 2 – Солодка зловонная (*Glycyrrhiza foetidissima* Tausch.); 3 – Солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L., подвид *grandulifera*); 4 – Солодка голая (*Glycyrrhiza glabra* L.); 5 – Солодка уральская (*Glycyrrhiza uralensis* Fisch.); 6 – СО пиноцембрина; 7 – СО изоглабранина; 8 – СО генистеина.

В траве солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) обнаруживаются, выделенные флавоноиды – пиноцембрин, изоглабринин, генистеин. Величина R_f СО пиноцембрина = 0,57, R_f СО изоглабранина = 0,64. Генистеин ($R_f = 0,40$) содержится в минимальном количестве, поэтому не обнаружен методом ТСХ, т.к. он менее чувствительный (обнаруживаются только следы).

В траве солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L., подвид *grandulifera*) обнаруживается пиноцембрин. Величина R_f СО пиноцембрина = 0,57.

5. Исследование компонентного состава травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.) методом ВЭЖХ

Было проведено исследование компонентного состава водно-спиртовых извлечений травы солодки голой и солодки уральской методом ВЭЖХ при детекции длины волны 290 нм. При проведении качественного анализа методом ВЭЖХ, исследование извлечений проводились с использованием стандартных образцов ликвиритигенина (1), генистеина (2), пиноцембрина (3), изоглабранина (4).

Объем инжестируемых проб для извлечений из травы солодки голой и солодки уральской, а также растворов образцов ликвиритигенина, генистеина, пиноцембрина изоглабранина – 2 мкл.

По результатам проведенного хроматографического исследования в градиентном режиме (табл. 2) для извлечения травы солодки голой было установлено, что возможно идентифицировать диагностически значимый флавоноид – пиноцембрин, а также ликвиритигенин, генистеин, изоглабринин (рис. 9).

Таблица 2 – Профиль градиента хроматографического разделения

Время, мин	ПФА, %	ПФБ, %
0-5	30	70
5-15	50	50
15-20	60	40
20-25	80	20

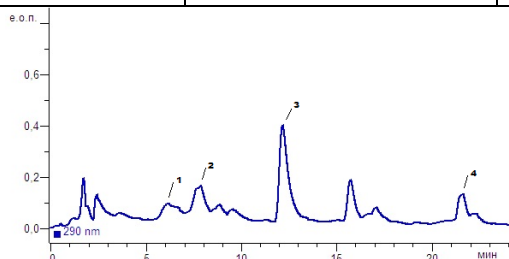


Рисунок 9 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из травы солодки голой: 1 – ликвиритигенин; 2 – генистеин; 3 – пиноцембрин; 4 – изоглабринин.

В таблице 3 представлено сравнение время удерживания пиков на хроматограммах между извлечением и стандартных образцов.

Таблица 3 – Время удерживания пиков на хроматограммах извлечения и стандартных образцов

Флавоноид	Время удерживания на хроматограмме, мин	
	Стандартный образец	Извлечение
Ликвиритигенин (пик 1)	6,57	6,52
Генистеин (пик 2)	7,43	7,64
Пиноцембрин (пик 3)	12,22	12,34
Изоглабринин (пик 4)	21,60	21,54

При добавлении раствора стандартного образца пиноцембрина в извлечение травы солодки голой наблюдается увеличение интенсивности пика пиноцембрина, что свидетельствует о наличии вещества в объекте (рис. 10).

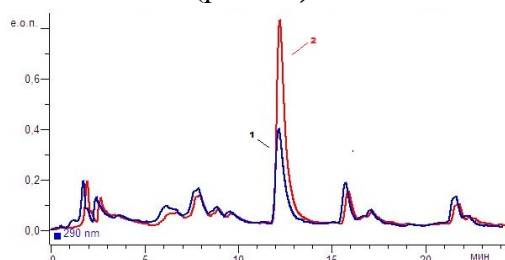


Рисунок 10 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из травы солодки голой с добавлением пиноцембрина: 1 – извлечение травы солодки голой; 2 – извлечение травы солодки голой после добавления СО пиноцембрина.

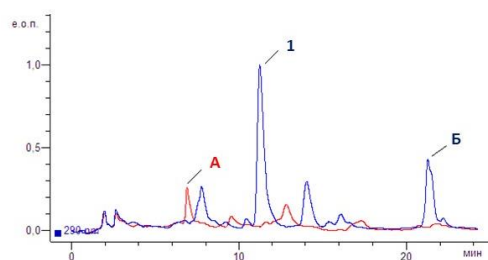


Рисунок 11 – Сравнительная ВЭЖХ-хроматограмма извлечения травы солодки голой и солодки уральской: А – солодка уральская; Б – солодка голая; 1 – СО пиноцембрина.

При сравнении двух хроматограмм извлечений травы солодки голой и солодки уральской наблюдаем, что компонентный состав различен (рис. 11).

По результатам сравнительного ВЭЖХ-анализа были установлены особенности компонентного состава травы солодки голой и солодки значимым флавоноидом для травы солодки голой является пиноцембрин.

6. Разработка подходов к стандартизации травы солодки голой

6.1. Качественный анализ травы солодки голой

Фитохимический анализ травы солодки голой показал, что для качественного определения БАС в сырье рационально использовать ТСХ-анализ в системе «хлороформ-этанол» (16:1). Проведенное исследование по изучению компонентного состава травы солодки, позволило выявить диагностически значимое соединение – пиноцембрин. Поэтому в качестве вещества-свидетеля предлагаем использовать СО пиноцембрина (рис. 12).

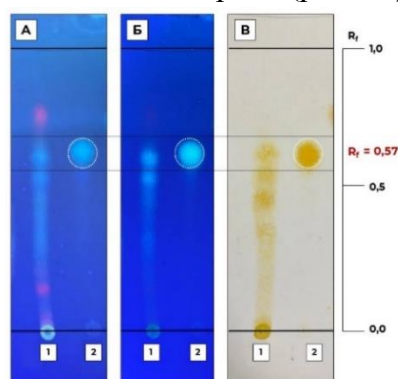


Рисунок 12 – Схемы хроматограмм водно-спиртового извлечения травы солодки голой в системе растворителей: хлороформ – этанол (16:1): А – детекция в УФ-свете (365 нм); Б – детекция после обработки спиртовым раствором алюминия хлорида в УФ-свете (365 нм); В – детекция в видимом свете после обработки щелочным раствором ДСК
Обозначения: 1 – 70% водно-спиртовое извлечение; 2 – СО пиноцембрина.

При визуальном осмотре хроматограммы извлечения травы солодки голой были выявлены хроматографические зоны, характерные в данной системе растворителей хлороформ – этанол (16:1), для вещества-свидетеля – СО пиноцембрина ($R_f = 0,57$) (табл. 4).

Таблица 4 – Варианты детекции в ТСХ-анализе

Способы детекции	Описание аналитического эффекта
Детекция в УФ-свете при длине волны 365 нм	<u>До проявления:</u> Зона адсорбции светло-голубого цвета на уровне СО пиноцембрина. <u>После проявления спиртовым раствором $AlCl_3$:</u> Зона адсорбции ярко-голубого цвета на уровне СО пиноцембрина.
Детекция в видимом свете	<u>После проявление раствором ДСК:</u> Зона адсорбции темно-рыжего цвета на уровне СО пиноцембрина.

Для качественного определения сырья и препаратов нами рекомендовано проведение дифференциальной спектрофотометрии при длине волны 310 нм.

Следовательно, характер спектров поглощения извлечений травы солодки голой подтверждает данные ТСХ-анализа и целесообразность использования в качестве стандартного образца пиноцембрина. СО пиноцембрина использован нами при разработке методик количественного определения БАС сырья и препаратов из травы солодки голой.

6.2. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой

В результате проведенного эксперимента определены оптимальные параметры экстракции БАВ из травы солодки голой: экстрагент – 90% этиловый спирт; соотношение «сырье-экстрагент» – 1:50; время экстракции – 60 мин; степень измельчения – 2 мм. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой с использованием метода дифференциальной УФ-спектрофотометрии с использованием СО пиностробина при аналитической длине волны 310 нм в пересчете на пиноцембрин.

В связи с тем, что пиноцембрин как стандартный образец не зарегистрирован в РФ, нами была изучена возможность использования СО пиностробина (ФС 42-0073-01), близкого по химическому строению и спектральным характеристикам пиноцембрину.

При использовании СО пиностробина нами осуществляется пересчет содержания суммы флавоноидов на пиноцембрин путем введения в формулу расчета коэффициента перерасчета. В случае отсутствия СО пиностробина используется теоретическое значение удельного поглощения пиностробина, установленное нами экспериментально.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в водно-спиртовом извлечении травы солодки голой. Около 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96% (испытываемый раствор А), перемешивают и оставляют на некоторое время (40 минут) для образования комплекса флавоноидов с алюминием. Затем измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 310 нм. В качестве раствора сравнения используют спирт этиловый 96%.

Параллельно проводят измерение оптической плотности СО пиностробина при длине волны 310 нм (дифференциальный вариант).

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

$$x = \frac{D * m_0 * 50 * 50 * 1,05 * 100}{D_0 * m * 50 * 25 * (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D_0 – оптическая плотность раствора СО пиностробина; m – масса сырья, г; m_0 – масса СО пиностробина, г; W – потеря в массе при высушивании в процентах; 1,05 – коэффициент пересчета.

Метрологические характеристики предлагаемой методики количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой описаны в таблице 14. Относительная погрешность определения среднего значения составляет $\pm 0,73$ % при доверительной вероятности равной 95 % (табл. 5).

Таблица 5 – Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой

n	f	$\bar{X}$, %	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	P, %	t (P, f)	$\pm \Delta X$	$\pm \Delta \bar{X}$	E, %	$\bar{E}$, %
11	10	3,41	0,0014	0,0369	0,011	95	2,23	0,0823	0,0248	$\pm 2,41$	$\pm 0,73$

Критерием оценки аналитической методики является валидационная оценка. Валидацию методики проводили в соответствии с ГФ РФ XV издания.

Специфичность методики определялась по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов травы солодки голой и раствора СО пиностробина с алюминием хлоридом и дифференциального пика СО пиностробина.

Линейность методики определяли для серии растворов пиностробина (с концентрациями в диапазоне от 0,016 до 0,16 мг/мл: 0,016; 0,032; 0,08; 0,16) с алюминием хлоридом при длине волны 310 нм. На основании полученных данных строили график зависимости значений оптической плотности растворов пиностробина с алюминием хлоридом от концентрации пиностробина и затем рассчитывали уравнение линейной регрессии. Коэффициент детерминации при этом составил 0,9981.

Метрологические характеристики методик количественного определения содержания суммы флавоноидов в водно-спиртовом извлечении травы солодки голой представлены в таблице 3. Результаты оценки промежуточной прецизионности результатов проведенных опытов свидетельствует об удовлетворительной воспроизводимости результатов анализа. Ошибка единичного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 0,73\%$.

Правильность методики определяли методом добавок раствора стандартного образца пиностробина с известной концентрацией (25%, 50% и 75%) к испытуемому раствору водно-спиртового извлечения травы солодки голой. Относительная ошибка анализа составила $\pm 0,27\%$. Опыты с добавками СО пиностробина к навеске сырья показали, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки разработанной методики.

Определено, что содержание суммы флавоноидов в анализируемых образцах варьирует от $0,39\% \pm 0,002$ до $3,41\% \pm 0,015$ в зависимости от места произрастания и года сбора растительного сырья.

6.3. Разработка методики количественного определения пиноцембрина в траве солодки голой

Хроматографический анализ осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ в градиентном режиме в следующих условиях: изократический режим, стальная колонка «КАХ-6-80-4» (№2; 2 мм x 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), элюентная система: ацетонитрил (ПФА) – 1% раствор уксусной кислоты (ПФБ), скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента - 2500 мкл. Детекцию веществ осуществляли при длине волны 290 нм. Объемы инжестируемых проб 2 мкл. Профиль градиента представлен в таблице 6

Таблица 6 – Профиль градиента хроматографического разделения

Время, мин	ПФА, %	ПФБ, %
0-5	30	70
5-15	50	50
15-20	60	40
20-25	80	20

Методика количественного определения пиноцембрина в траве солодки голой. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 90% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 минут. Затем колбу охлаждают в течение 30 минут, закрывают той же пробкой, снова взвешивают

и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр («Красная лента»). Перед хроматографическим анализом дополнительно фильтруют через мембранный фильтр Milipore (0,22 мкм).

Проводят УФ-детектирование при длине волны 290 нм, диапазон чувствительности 0,5. Проводят не менее 3 параллельных определений.

Параллельно 2 мкл раствора пиноцембрина вводят в хроматограф и хроматографируют, как описано выше. Определяют время удерживания и идентифицируют пик пиноцембрина на хроматограмме испытуемого раствора. Вычисляют площадь пика пиноцембрина на хроматограмме и рассчитывают среднюю площадь пика по 3 параллельным определениям.

Содержание пиноцембрина в траве солодки голой в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{S * m_0 * V * V_2 * 100 * 100}{S_0 * m * V_0 * V_1 * (100 - W)},$$

Где S – среднее значение площади пика пиноцембрина испытуемого раствора, вычисленное из хроматограмм раствора испытуемого образца; S₀ – среднее значение площади пика раствора СО пиноцембрина, вычисленное из хроматограмм раствора СО пиноцембрина; V – объем извлечения, мл; V₁ – объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл; V₀ – объем раствора СО пиноцембрина, мл; V₂ – объем вводимой пробы раствора СО пиноцембрина, мкл; m – масса сырья, г; m₀ – масса СО пиноцембрина г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Метрологические характеристики разработанной методики ВЭЖХ-анализа свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения содержания пиноцембрина в траве солодки голой с доверительной вероятностью 95% составляет ±6,30% (табл. 7).

Таблица 7 – Метрологические характеристики методики количественного определения пиноцембрина в траве солодки голой

n	f	$\bar{X}, \%$	S ²	S	S $\bar{x}$	P, %	t (P, f)	±ΔX	±Δ $\bar{X}$	E, %	$\bar{E}, \%$
11	10	1,27	0,0014	0,037	0,011	95	2,23	0,08	0,02	±6,30	±1,57

С целью проверки пригодности хроматографической системы проводили 5-кратное хроматографирование 2 мкл раствора извлечения травы солодки голой. Показатель эффективности хроматографической колонки составил 5954 теоретических тарелок, разрешение между пиками – 1,48, фактор асимметрии – 1,48.

Для валидации проводилась оценка аналитической методики по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность. Специфичность методик количественного определения содержания пиноцембрина определялась по показателю разрешение между пиками. Зависимость высоты и площади хроматографического пика от концентрации пиноцембрина описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 0,04 до 0,4 мг/мл, однако коэффициент корреляции для зависимости высоты пика от концентрации пиноцембрина составил 0,9873, для зависимости площади пика от концентрации – 0,9975. Поэтому определение содержания пиноцембрина проводили с использованием площади пика. Правильность методики определяли методом добавок.

Установлено, что количественное содержание доминирующего вещества – пиноцембрина для травы солодки голой, определенное с помощью метода ВЭЖХ, варьирует от 0,39 % до 1,28 %. Разработанная методика количественного определения пиноцембрина в траве солодки голой методом ВЭЖХ включена в проект фармакопейной статьи «Солодки голой трава».

7. Усовершенствование подходов к стандартизации корней солодки

7.1. Разработка методики качественного анализа БАС растительного сырья корней солодки

Нами были изучены условия хроматографического разделения, позволяющие обнаруживать ведущие группы БАС – глицирризиновую кислоту и ликуразид (рис. 13). Для определения веществ были использованы СО ликуразида и ГСО глицирама, система растворителей *n*-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:2).

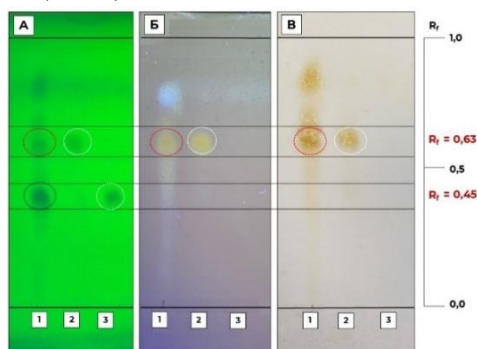


Рисунок 13 – Хроматограммы водно-спиртового извлечения корней солодки:

А – детекция при длине волны 254 нм; Б – детекция при длине волны 365 нм после обработки AlCl_3 ; Б – детекция в видимом свете после обработки ДСК.

Обозначения: 1 – извлечение корней солодки; 2 – СО ликуразида; 3 – ГСО глицирама.

На хроматограмме водно-спиртового извлечения при длине волны 365 нм после обработки AlCl_3 обнаруживается желто-оранжевое пятно с величиной R_f около 0,63 (на уровне СО ликуразида) (рис. 1Б), а глицирризиновая кислота – в виде темного синего флуоресцирующего пятна (254 нм) с величиной R_f около 0,45 (на уровне ГСО глицирама) (рис. 1А).

7.2. Разработка методики количественного анализа БАС растительного сырья корней солодки голей

Хроматографический анализ осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») в следующих условиях: изократический режим, стальная колонка «КАХ-6-80-4» (2 мм x 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), подвижная фаза – ацетонитрил: 1% раствор уксусной кислоты в воде в соотношении 4:6 (при определении содержания глицирризиновой кислоты) или 2:8 (при определении содержания ликуразида), скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента – 2500 мкл. Детекцию веществ осуществляли при длинах волны 256 нм (глицирризиновая кислота) и 360 нм (ликуразид). Объемы инжестируемых проб извлечений из корней солодки и стандартных образцов: 3 мкл (глицирризиновая кислота) и 5 мкл (ликуразид).

Методика количественного определения глицирризиновой кислоты в корнях солодки. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл 40% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до 0,01. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 минут. Затем колбу охлаждают в течение 30 минут, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через

бумажный фильтр. Аликвоту полученного извлечения фильтруют через мембранный фильтр Millipore (0,45 мкм) (испытуемый раствор). Проводят не менее 3 параллельных определений.

Параллельно 3 мкл стандартного раствора глицирама вводят в хроматограф и хроматографируют, как описано выше. Проводят определение площади пика глицирама и рассчитывают среднюю площадь пика по результатам 3 определений. Определяют время удерживания и идентифицируют пик глицирризиновой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора. Вычисляют площадь пика глицирризиновой кислоты на хроматограмме и рассчитывают среднюю площадь пика по 3 параллельным определениям.

Содержание глицирризиновой кислоты в корнях солодки в пересчете на глицирам и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X, \% = \frac{S * m_0 * V * V_2 * 100 * 100}{S_0 * m * V_0 * V_1 * (100 - W)},$$

где S – среднее значение площади пика глицирризиновой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора; S₀ – среднее значение площади пика глицирама, вычисленное из хроматограмм стандартного раствора глицирама; V – объем извлечения, мл; V₁ – объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл; V₀ – объем раствора ГСО глицирама, мл; V₂ – объем вводимой пробы раствора ГСО глицирама, мкл; m – масса сырья, г; m₀ – масса ГСО глицирама, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Методика количественного определения ликуразида в корнях солодки.

Пробоподготовка схожа по описанию в «Методике количественного определения глицирризиновой кислоты в корнях солодки». Параллельно 5 мкл стандартного раствора ликуразида вводят в хроматограф и хроматографируют, как описано выше. Проводят определение площади пика ликуразида и рассчитывают среднюю площадь пика по результатам 3 определений.

Определяют время удерживания и идентифицируют пик ликуразида на хроматограмме испытуемого раствора. Вычисляют площадь пика ликуразида на хроматограмме и рассчитывают среднюю площадь пика по 3 параллельным определениям.

Содержание ликуразида в корнях солодки в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X, \% = \frac{S * m_0 * V * V_2 * 100 * 100}{S_0 * m * V_0 * V_1 * (100 - W)},$$

где S – среднее значение площади пика ликуразида на хроматограмме испытуемого раствора; S₀ – среднее значение площади пика ликуразида, вычисленное из хроматограмм стандартного раствора ликуразида; V – объем извлечения, мл; V₁ – объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл; V₀ – объем раствора ГСО ликуразида, мл; V₂ – объем вводимой пробы раствора ГСО ликуразида, мкл; m – масса сырья, г; m₀ – масса ГСО ликуразида, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Метрологические характеристики разработанных методик ВЭЖХ-методик свидетельствует о том, что относительная ошибка определения среднего арифметического результата содержания глицирризиновой кислоты в корнях солодки с доверительной вероятностью 95 % составляет ±4,11 %, ликуразида – ±4,76 % (табл. 10).

Таблица 10 – Метрологические характеристики методики количественного определение глицирама и ликуразида в корнях солодки

БАС	n	f	$\bar{X}, \%$	S	P, %	t (P, f)	$\pm \Delta \bar{X}$	$\bar{E}, \%$
-----	---	---	---------------	---	------	----------	----------------------	---------------

Глицирризиновая кислота	11	10	4,44	0,27131	95	2,23	±0,18	±4,11
Ликуразид	11	10	0,340	0,02408	95	2,23	±0,016	±4,76

С целью проверки пригодности хроматографической системы проводили 5-кратное хроматографирование 4 мкл раствора извлечения корней солодки. Для глицирризиновой кислоты показатель эффективности хроматографической колонки составил 5477 теоретических тарелок, разрешение между пиками – 2,89, фактор асимметрии – 1,11; для ликуразида показатель эффективности хроматографической колонки составил 5577 теоретических тарелок, разрешение между пиками 2,19, фактор асимметрии – 1,26.

Для валидации проводилась оценка аналитической методики по следующим характеристикам: специфичность, линейность, правильность. Специфичность методик количественного определения содержания ликуразида и глицирризиновой кислоты определялась по показателю разрешение между пиками. Зависимость высоты и площади хроматографического пика от концентрации глицирама описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 0,1840 до 1,4720 мг/мл, коэффициент детерминации – 0,9994. Для ликуразида зависимость высоты и площади хроматографического пика описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 0,1424 до 0,7120 мг/мл, коэффициент детерминации – 0,9990.

Правильность методики определяли методом добавок путем добавления растворов глицирама и ликуразида с известной концентрацией (80 %, 100 % и 120 %) к испытуемому раствору. При этом средний процент восстановления составил 97,2 % и 96,5 % соответственно. Ошибки определения глицирризиновой кислоты и ликуразида в пробах с добавками стандартных образцов находились в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки.

Установлено, что количественное содержание глицирризиновой кислоты (в пересчете на глицирам) в корнях солодки варьировало от 3,23 % до 4,01 %, ликуразида – от 0,209 % до 0,324 % в зависимости от места произрастания и года сбора растительного.

8. Определение фармакологической активности густого экстракта травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и индивидуальных веществ

Проведено исследование фармакологической активности густого экстракта травы солодки голой, а также флавоноидов – пиноцембрин, генистеин, изоглабрин.

Было обнаружено, что при однократном внутрижелудочном введении пиноцембрина в дозе 1 мг/кг происходит значительное увеличение диуреза на 25% и кренинурия на 45% в экспериментальной группе по сравнению с группой водного контроля в течение 4 ч эксперимента.

Полученные результаты свидетельствуют об антидепрессивном действии у крыс после однократного внутрижелудочного введения густого экстракта травы солодки голой в дозе 10 мг/кг по сравнению с контрольной группой на 170%. Пиноцембрин в дозе 1 мг/кг вызвал достоверное повышение двигательной активности на 6%, предполагая наличие антидепрессантной активности. Кроме того, генистеин в дозе 1 мг/кг достоверно повышал двигательную активность опытных животных на 7%.

По результатам исследования острой токсичности, было определено, что густой экстракт травы солодки голой относится к IV классу токсичности (малоопасные вещества).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное фармакогностическое исследование корней и травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) и солодки уральской (*Glycyrrhiza uralensis* Fish.) позволило сделать следующие общие выводы:

1. В результате сравнительного морфологического исследования травы солодки голой и солодки уральской, а также примесных видов рода Солодка определено, что морфологическими диагностическими признаками для травы солодки голой являются: верхняя и нижняя поверхности усажены точечными железками, клейкими от обильных выделений; центральная жилка с нижней стороны листочка густо опушена; поверхность черешка густоопушенная и скудно-железистая. Плод прямой слегка извилистый; поверхность голая без опушения. Цветок с тремя фиолетовыми крылами, двумя сросшимися зеленоватыми парусами с фиолетовым оттенком, вдвое короче, чем крыло. Парус ярко выражен морфологически.

Отличительной чертой солодки голой является ромбообразная форма поперечного сечения рахиса в медиальной части с V-образной выемкой с адаксиальной стороны. Дополнительные диагностические признаки, присутствующие в всех частях травы солодки голой и дающие селективную диагностику таксона являются: бичевидные волоски с мелкоклеточным основанием и длинной остроконечной клеткой; желёзки с крупной многоклеточной головкой; пигментированные клетки с оранжевым пигментом, реагирующим на раствор NaOH с потемнением окраски и с раствором сернокислого анилина с окрашиванием в тёмно-бурый до черного цвета.

2. Впервые из травы солодки голой методом колоночной хроматографии были выделены флавоноидные вещества генистеин и изоглабрин, а из травы солодки голой культивируемой и произрастающей на территории РФ был впервые выделен пиноцембрин. С помощью сравнительного ТСХ-анализа в траве солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) были обнаружены, выделенные флавоноиды – пиноцембрин, изоглабрин. В траве солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L., подвид *grandulifera*) был выявлен флавоноид – пиноцембрин. Проведенное исследование компонентного состава травы солодки голой методом ВЭЖХ позволило установить, что диагностически значимым флавоноидом является пиноцембрин.

3. Разработаны методики качественного анализа определения флавоноидов в траве солодки голой с помощью ТСХ-анализа и дифференциальной спектрофотометрии. Для ТСХ-анализа была подобрана система растворителей хлороформ-этанол (16:1) со стандартным образцом пиноцембрина, с величиной $R_f = 0,57$. Установлены характерные максимумы поглощения извлечения травы солодки голой $\lambda_{max} = 310 \pm 2$ нм.

4. Разработана методика количественного содержания суммы флавоноидов (в пересчете на пиноцембрин) в траве солодки голой методом дифференциальной спектрофотометрии при детекции длине волны 310 нм. Определено, что содержание суммы флавоноидов в траве солодки голой варьирует от $0,39\% \pm 0,002$ до $3,41\% \pm 0,002$ с относительной ошибкой определения среднего значения $\pm 0,73\%$ с доверительной вероятностью 95%.

Впервые разработана методика количественного определения пиноцембрина в траве солодки голой методом ВЭЖХ при детекции длины волны 290 нм. Содержание пиноцембрина варьирует от $0,39\% \pm 0,007$ до $1,28\% \pm 0,022$ с относительной ошибкой определения среднего значения $\pm 6,30\%$ с доверительной вероятностью 95%.

5. Обосновано использование в методике качественного и количественного анализа травы солодки голой стандартного образца пиноцембрина, для которого разработан способ получения стандартного образца «Пиноцембрин» из травы солодки голой, позволяющий получать целевое вещество с выходом 1,0-1,5% от массы воздушного сырья.

6. Проанализирован процесс накопления суммы флавоноидов в траве солодки голой. Наблюдается плавное повышение уровня суммы флавоноидов в процессе развития растения. Для рационального использования травы солодки голой, рекомендуется проводить сбор растительного сырья в фазе активного плодоношения в середине августа.

7. Разработана методика качественного анализа методом ТСХ в системе растворителей *n*-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:2) с использованием стандартных образцов глицирризиновой кислоты и ликуразида. Разработана методика количественного определения глицирризиновой кислоты и ликуразида в корнях солодки методом ВЭЖХ в изократическом режиме элюирования. Содержание ликуразида в корнях солодки варьирует от 0,209%±0,008 и до 0,324%±0,010 с относительной ошибкой определения среднего значения ±4,76% с доверительной вероятностью 95%, глицирризиновой кислоты в корнях солодки варьирует от 3,23% ± 0,16 и до 4,01% ± 0,15 с относительной ошибкой определения среднего значения ±4,11% с доверительной вероятностью 95%.

8. В результате проведения исследования диуретической и нейротропной активности густого экстракта, а также выделенных флавоноидов пиноцембрина, генистеина и изоглабранина. Было установлено, что пиноцембрин в дозе 1 мг/кг у подопытных животных отмечалось достоверное увеличение диуреза (на 25%) и креатининуриза (на 45%). В тоже время, при однократном внутрижелудочном введении генистеина в дозе 1 мг/кг наблюдалось достоверное повышение диуреза на 33% в экспериментальной группе по сравнению с контрольной группой. Густой экстракт травы солодки голой в дозе 10 мг/кг, пиноцембрин и генистеин в дозах 1 мг/кг способствовали достоверному увеличению двигательной активности опытных животных, что свидетельствует об антидепрессантном действии исследуемых образцов. Определено, что трава солодки голой является перспективным видом ЛРС для получения безопасных и эффективных растительных лекарственных препаратов для длительной терапии хронических заболеваний.

9. Разработаны проекты фармакопейных статей на новый вид ЛРС «Солодки голой трава» и стандартного образца пиноцембрина.

Практические рекомендации. Разработанные в ходе диссертационной работы методы стандартизации травы солодки голой представляют собой объективную и качественную оценку данного растительного объекта и эффективно решают вопросы его идентификации.

Были разработаны проекты фармакопейной статьи «Солодки голой трава» и «Пиноцембрин – стандартный образец», которые рекомендуются для включения в ГФ РФ. Полученные результаты исследования, проведенного в рамках диссертации, имеют практическое применение в центрах сертификации и контроля качества ЛС и на фармацевтических предприятиях, а также в учебных процессах по дисциплинам «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия».

Перспективы дальнейшей разработки темы. Выполнение диссертационной работы играет важную роль в научно-практическом аспекте для достижения целей, связанных как с фармакогностическим, так и в целом фармацевтическим анализом. Это позволяет перспективным представителем рода Солодка внедрять в фармацевтическую практику и разрабатывать подходы к стандартизации других видов ЛРС и созданию новых ЛП. Таким образом, выполнение исследовательской работы имеет огромное значение для прогресса в фармации.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Белова, О.А. Актуальные вопросы стандартизации корней солодки / О.А. Белова, В.А. Куркин, Т.К. Рязанова // *Аспирантский вестник Поволжья*. – 2021. – № 5-6. – С. 30-35.

2. Куркин, В.А. Вопросы количественного определения биологических активных соединений корней солодки / В.А. Куркин, Т.К. Рязанова, М.В. Егоров, О.А. Белова // **Фармация**. – 2021. – Т. 70. – № 7. – С. 24-31.
3. Белова, О.А. Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой / О.А. Белова, В.А. Куркин, М.В. Егоров // **Фармация и фармакология**. – 2023. – Т.11. – № 2. – С. 127-136.
4. Белова, О.А. Разработка подходов к стандартизации травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) / О.А. Белова, В.А. Куркин, Е.А. Смирнова, М.В. Егоров // **Аспирантский вестник Поволжья**. – 2023. – Т. 23. – № 2. – С. 53-59.
5. Куркин, В.А. Определение содержания пиноцембрина в траве солодки голой методом ВЭЖХ / В.А. Куркин, О.А. Белова, А.Р. Мубинов, М.В. Егоров // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2023. – Т. 57. – № 10. – С. 32-36.
6. 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, Самара, 13–14 октября 2021 года / Под редакцией А.В. Колсанова и Г.П. Котельникова. – г. Самара: ООО "СамЛюксПринт", 2021. – С. 246-248.
7. Белова, О.А. Перспективы использования надземной части солодки голой в качестве фармакопейного сырья / О.А. Белова, В.А. Куркин // Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы: Сборник материалов, Самара, 26–27 октября 2021 года. – Самара: Самарский государственный медицинский университет, 2021. – С. 230-234.
8. Белова, О.А. Сравнительный ТСХ-анализ травы и корней солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) / О.А. Белова, В.А. Куркин // Инновации в медицине и фармации 2021: Сборник материалов Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых, Минск, 2021 год / Под редакцией С.П. Рубниковича, В.А. Филонюка – г. Минск: БГМУ – С. 487-490.
9. Белова, О.А. Определение содержания суммы флавоноидов в водно-спиртовом извлечении из травы солодки голой (*Glycyrrhiza glabra* L.) / О.А. Белова // Аспирантские чтения – 2022: Молодые ученые – медицине. Технологическое предпринимательство как будущее медицины. Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Самара, 23 ноября 2022 года / Под редакцией ректора СамГМУ, профессора РАН А.В. Колсанова. – г. Самара: ООО «Полиграфическое объединение «Стандарт», 2023. – С. 264-266.
10. Белова, О.А. Количественное определение биологически активных соединений корней солодки / О.А. Белова, В.А. Куркин // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: Сборник материалов XI Международного симпозиума, Москва, 11–15 апреля 2022 года / Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева РАН. – Москва: Издательство "Перо", 2022. – С. 52.
11. Белова, О.А. Изучение химического состава травы солодки голой физико-химическими и спектральными методами / Белова О.А., Куркин В.А., Егоров М.В. // V Гаммермановские чтения. Сборник научных трудов по материалам научно-методической конференции, Москва, 9-10 ноября 2023 г. – г. Москва: РУСАЙНС, 2023. – С. 43-47.

Патенты

1. Патент РФ на изобретение № 2806047. – (заявка №2022131284 от 30.11.2022 г.) «Способ количественного определения суммы флавоноидов в траве солодки голой» / О.А. Белова, В.А. Куркин, М.В. Егоров. – Решение о выдаче патента 25.10.2023 г.