

На правах рукописи

АФФУФ АБДУЛКАРИМ БАШАР

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЯКОРЦЕВ
СТЕЛЮЩИХСЯ *TRIBULUS TERRESTRIS L.*, ПРОИЗРАСТАЮЩИХ В
РОССИИ, СОПРЕДЕЛЬНЫХ ГОСУДАРСТВАХ И СИРИЙСКОЙ
АРАБСКОЙ РЕСПУБЛИКЕ**

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Пермь – 2020

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, доцент **Белоногова Валентина Дмитриевна**

Официальные оппоненты:

Ханина Миниса Абдуллаевна – доктор фармацевтических наук, профессор, государственное образовательное учреждение высшего образования Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет», кафедра химии, 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 с курсом ботаники и основ фитотерапии, профессор.

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Самара

Защита состоится «23» декабря 2020 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.068.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 614990, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2, тел./факс (342)233-55-01).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (614990, г. Пермь, ул. Крупской, д. 46) и на сайте (<http://pfa.ru>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «___» _____ 2020 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат химических наук

Замараева Татьяна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Исследования по обнаружению новых источников эффективных и безопасных лекарственных препаратов растительного происхождения является актуальной задачей.

Одним из перспективных видов лекарственного растительного сырья является трава якорцев стелющихся – *Tribuli terrestris herba*.

В Российской Федерации якорцы стелющиеся – *Tribulus terrestris L.* распространены в степной и полупустынной зонах, являются сорным растением. Растут в полупустынях Средней Азии, в Казахстане, Узбекистане, Таджикистане, Дагестане, Азербайджане. В странах Ближнего Востока, Северной Африки, в южной части Болгарии, в Австралии и Индии.

Трава якорцев стелющихся обладает гиполипидемическим, общетонизирующим, обезболивающим, противовоспалительным и мочегонным действием. Используется для стимуляции функции половых желез, лечения андрологических заболеваний, способствует естественному производству тестостерона, а также стимулирует секрецию желудочного сока и усиливает перистальтику кишечника.

Богатый химический состав сырья является основой для создания перспективных растительных препаратов, обогащенных сапонинами и флавоноидами.

Для эффективности использования лекарственных средств важно установить видовую принадлежность исходного сырья, провести качественную и количественную оценку содержания в нем наиболее перспективных групп биологически активных веществ, обуславливающих фармакологическое действие.

Существующий нормативный документ на сырье якорцев стелющихся, ВФС 42-827-79, не соответствует современным требованиям.

В разделе «Внешние признаки», дано описание только для цельного сырья, в разделе «Микроскопические признаки» указано описание только анатомических признаков листа. Нет описания морфологических признаков измельченного сырья, анатомических признаков других морфологических органов, входящих в лекарственное растительное сырье «трава». Нет микрофотографий, что затрудняет диагностику сырья. В разделе «Определение основных групп биологически активных веществ» приведена тонкослойная хроматография только для определения фураностаноловых гликозидов, нет тонкослойной хроматографии для определения флавоноидов. Оценка качества сырья предусмотрена также только по фураностаноловым гликозидам. Однако, якорцев стелющихся трава содержит комплекс биологически активных веществ (стероидные сапонины: диосцин, протодиосцин, трибестин, прототрибестин,

метилпроторибестин, метилпротодиосцин, псевдопротодиосцин, трибулозин и др., флавоноиды, фенол – карбоновые кислоты, алкалоиды, каротиноиды, высшие жирные кислоты), поэтому необходимо дополнить оценку качества сырья по содержанию экстрактивных веществ и суммы флавоноидов. В связи с этим ВФС 42-827-79 «Якорцев стелющихся трава» подлежит доработке, поэтому необходимость комплексного фармакогностического исследования якорцев стелющихся травы актуальна.

Степень разработанности темы. Исследования по изучению якорцев стелющихся травы проводились отечественными и зарубежными учеными. Были изучены сырьевая база и химический состав якорцев стелющихся. Доказано наличие стероидных сапонинов и веществ фенольной природы. Из якорцев стелющихся травы болгарской компанией АО «Софарма» получен препарат «Трибестан», который оказывает общетонизирующее действие, стимулирует функции половой системы. У мужчин восстанавливает и улучшает сексуальное либидо, удлиняет время эрекции. Стимулирует сперматогенез, увеличивая количество сперматозоидов и их подвижность. Обладает гиполипидемическим действием. Действующий нормативный документ не позволяет объективно проводить оценку качества сырья, так как не соответствует современным требованиям.

Цель работы: фармакогностическое исследование якорцев стелющихся, произрастающих в России, сопредельных государствах, Сирийской Арабской республике и стандартизация сырья.

Задачи исследования:

1. Провести анализ литературных данных о видах рода *Tribulus L.*
2. Изучить морфологические и анатомические признаки якорцев стелющихся травы (лист, стебель, цветок, корень) и выявить основные анатомо – диагностические признаки, выполнить микрофотографии указанных органов
3. Провести фитохимический анализ на основные группы биологически активных веществ и разработать показатели оценки качества сырья с учетом путей использования.
4. Провести стандартизацию и разработать нормативный документ на якорцев стелющихся траву – *Tribulus terrestris herba*.

Научная новизна. Впервые проведено анатомическое исследование травы якорцев стелющихся по органам (лист, стебель, цветок и корень), выполнены микрофотографии. Определены основные биометрические показатели анатомических и морфологических признаков. С помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии подтверждено наличие стероидных сапонинов (диосцин и протодиосцин). Предложен метод тонкослойной хроматографии для

качественного определения флавоноидов. Определен микроэлементный состав якорцев стелющихся травы. Впервые определено содержание действующих веществ (суммы флавоноидов) и разработана методика их количественного определения в сырье якорцев стелющихся, заготовленных в разных регионах. Проведена валидация методики количественного определения суммы флавоноидов. Подобран экстрагент, который максимально извлекает экстрактивные вещества и определено количество экстрактивных веществ в сырье. Проведена стандартизация сырья якорцев стелющихся. На основе результатов исследования разработан проект фармакопейной статьи «Якорцев стелющихся трава – *Tribuli terrestris herba*», который отправлен на рассмотрение в федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения».

Теоретическая и практическая значимость работы.

Согласно современным требованиям проведена стандартизация сырья и разработан проект фармакопейной статьи «Якорцев стелющихся трава – *Tribuli terrestris herba*», для включения в Государственную Фармакопею Российской Федерации. Составлены и переведены на английский язык методики идентификации и оценки качества сырья якорцев стелющихся для использования в практике Министерства Здравоохранения Сирийской Арабской Республики.

Внедрение результатов исследования.

Материалы диссертации используются в учебном процессе, при проведении практических занятий со студентами и ординаторами, а также в научно – исследовательской работе кафедры фармакогнозии с курсом ботаники федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Материалы диссертации используются в учебном процессе в лаборатории института биохимической технологии и нанотехнологии Российского университета дружбы народов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности.

Научные положения диссертации соответствуют формуле 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки). Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 2,3,5 паспорта специальности. Пункт 2 – «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»; пункт 3 – «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля

качества лекарственных средств на этапах их разработки, производство и потребление»; пункт 5 – «Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе».

Положения, выносимые на защиту.

1. Результаты макроскопического и микроскопического анализа якорцев стелющихся травы.
2. Результаты фитохимического исследования якорцев стелющихся травы: качественные химические реакции на основные группы биологически активных веществ; высокоэффективная жидкостная хроматография на стероидные сапонины (диосцин и протодиосцин), исследования элементного состава якорцев стелющихся травы.
3. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве.
4. Результаты исследований по стандартизации якорцев стелющихся травы.

Публикации по теме диссертации.

Основные результаты исследования легли в основу 9 печатных работ, в том числе 3 статьи в журналах, включенных в Перечень ВАК Минобрнауки России, 1 – в библиографической и реферативной базе данных «SCOPUS».

Личный вклад автора. Автором выполнены исследования по изучению морфолого – анатомических признаков якорцев стелющихся травы. Выявлены диагностические анатомические признаки, выполнены микрофотографии, определены основные биометрические показатели анатомических признаков якорцев стелющихся травы. Изучен микроэлементный состав якорцев стелющихся травы. Разработана и валидирована методика количественного определения суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве. Проведена стандартизация, разработаны показатели качества, составлен проект фармакопейной статьи «Якорцев стелющихся трава – *Tribulus terrestris herba*». Автором подготовлены статьи для публикации, проект нормативной документации, автореферат и текст диссертации.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 247 страницах машинописного текста, содержит 58 таблиц и 43 рисунка; состоит из введения, шести глав, заключения и выводов, списка использованных литературных источников, включающего 144 наименований, в том числе 48 на иностранном языке, 2 приложения.

Глава 1 посвящена обзору литературы отечественных и зарубежных авторов. В обзоре литературы обобщены сведения по морфологическим и

анатомическим признакам, ареалу и местам обитания, химическому составу, медицинскому применению и препаратам якорцев стелющихся травы.

В экспериментальной части дана характеристика объектов и методов исследования (глава 2). В главе 3 представлены результаты морфолого – анатомических признаков якорцев стелющихся травы по органам (лист, стебель, цветок, корень), определены основные биометрические параметры анатомических признаков, в главе 4 – материалы по фитохимическому исследованию сырья якорцев стелющихся, в главе 5 – результаты по разработке и валидации методики количественного определения суммы флавоноидов, в главе 6 – результаты стандартизации сырья якорцев стелющихся.

Диссертационная работа завершается общими выводами и списком литературы.

Приложение включает Проект Фармакопейной статьи, методики идентификации сырья на английском языке, акты внедрения, подтверждающие практическую значимость результатов исследования.

Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов проведена автором и прошла межлабораторную экспертизу в региональном испытательном центре «Фарматест» ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России (заведующая лабораторией доктор фармацевтических наук, профессор Малкова Т.Л.).

Автор выражает благодарность доктору фарм. наук, профессору кафедры промышленной технологии с курсом биотехнологии Молоховой Е.И. за предоставленные образцы якорцев стелющихся травы, собранные в Крыму, Молдове и ботаническом саду ВИЛАР, а также за стандартный образец протодиосцина.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Исследования проводили на индивидуальных образцах травы якорцев стелющихся – *Tribuli terrestris herba*, сем. *Zygophyllaceae*, собранных в Российской Федерации: в республике Крым и ботаническом саду ВИЛАР; в Молдове, Сирии и также промышленных образцах фирмы *Narraz* производства Египет, заготовленных в течение 2016 – 2019 г.г.

Макроскопический и микроскопический анализ проводили по методикам ГФ XIV издания.

Изучение анатомических признаков проводили с помощью микроскопа «Биомед 6», увеличение 640х, 400х, 160х.

Для микрофотографирования использовали цифровую камеру DCM 510, программа *Scope Photo*.

Размеры клеток измеряли с помощью окуляр – микрометра. Результаты обработали в программе *Microsoft Excel*.

Качественный анализ проводили по стандартным методикам. Наличие действующих веществ устанавливали с помощью общепринятых качественных реакций и с помощью методов хроматографии.

ВЭЖХ – анализ проводили на жидкостном тройном квадрупольном хроматомакс – спектрометре LCMS – 8050 (Shimadzu). Подготовку образцов для исследования проводили по следующей методике: около 0,5 г измельченного сырья (точная навеска) помещали в коническую колбу объемом 100 мл и заливали 25 мл метанола (х.ч.), далее проводили экстракцию содержимого колбы на ультразвуковой бане в течение 30 минут при температуре 30 ± 1 °С. 1 мл полученного извлечения переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали в течение 5 минут при 10 000 об/мин. 50 мкл супернатанта помещали в виалу объемом 2 мл, добавляли 950 мкл метанола и перемешивали. Объем анализируемой пробы составил 5 мкл.

Изучение элементного состава проводили с использованием рентгено – флуоресцентного метода, рекомендованного для исследования элементного состава лекарственного сырья ГФ XIV издания. Подготовку образцов сырья проводили по следующей методике: навеску около 10 г сухого сырья измельчали до порошкообразного состояния, помещали в тигель и сжигали на плитке до прекращения дымления. Тигли помещали в муфельную печь при температуре 500 °С, выдерживали в муфельной печи около 2 ч, до полного озоления и отсутствия черной угольной массы. После полного охлаждения тиглей добавляли азотную кислоту 50 % и выпаривали её на плитке с закрытой спиралью, в вытяжном шкафу, избегая разбрызгивания, затем помещали в муфельную печь при температуре 500 °С на 2 ч.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Морфолого – анатомические признаки якорцев стелющихся травы

Морфолого – анатомическое исследование проводили по органам (лист, цветок, стебель, корень), готовили по 30 микропрепаратов с каждого образца.

1.1. Анатомическое строение листа

Клетки эпидермиса продолговатой, реже круглой формы, контур клеток слабоизвилистый, имеются утолщения в углах клеток. Устьица расположены с обеих сторон листа, больше на нижней стороне листа. Устьица окружены 3 – 5 околостыичными клетками (аномоцитный тип) (рис. 1). По краю и по всей поверхности листа, с нижней и верхней стороны, расположены простые одноклеточные волоски разной длины (длинные, средние, короткие) и ширины (рис.2 – 3). На верхушке листа преимущественно встречаются короткие волоски

(рис.4). У места прикрепления волоска клетки эпидермы располагаются радиально, образуя розетку (рис.5). В мезофилле листа встречаются кристаллы оксалата кальция – друзы (рис.6).

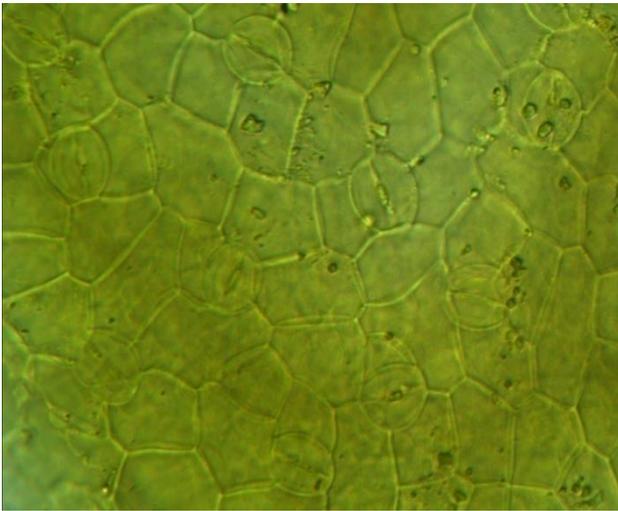


Рис.1. Устьица аномоцитного типа.



Рис.2. Волоски по краю листа.

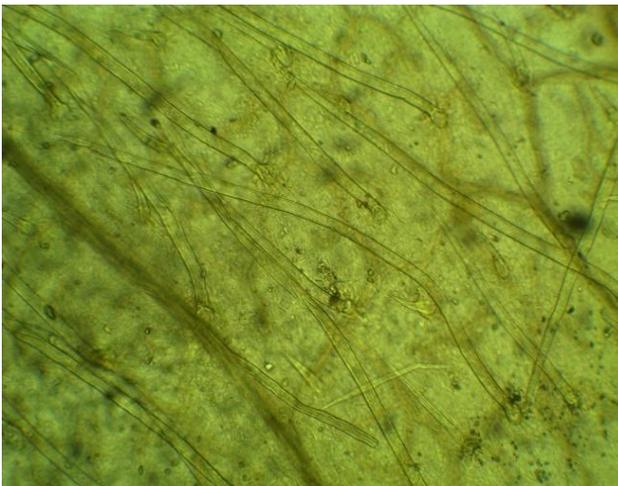


Рис.3. Волоски по поверхности листа.



Рис.4. Волоски у верхушки листа.

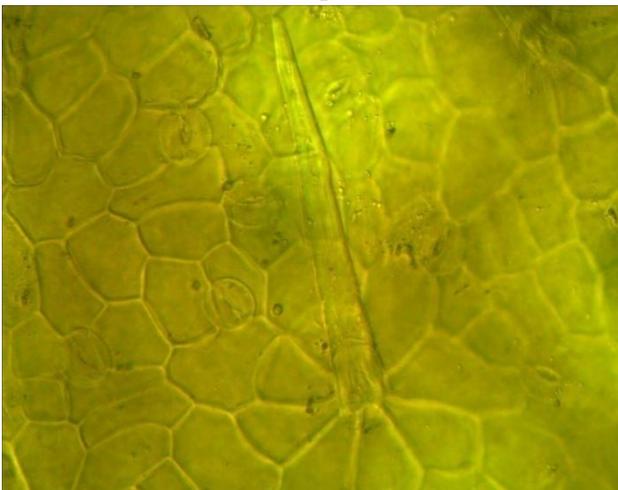


Рис.5. Радиальное расположение клеток эпидермы.

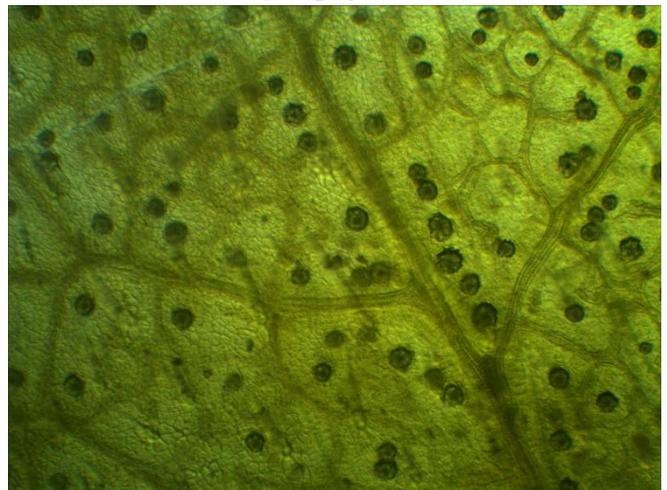


Рис.6. Кристаллы оксалата кальция – друзы.

1.2. Анатомическое строение стебля

Покровная ткань стебля – эпидермис, который покрыт слоем кутикулы. Первичная кора состоит из 5 – 8 слоев паренхимы. Перикцикл из 4 – 7 слоев клеток склеренхимы с небольшими межклетниками. Проводящая система – непучкового строения. Сердцевина большая состоит из паренхимных клеток (рис.7). В первичной коре и сердцевине обнаружены кристаллы оксалата кальция – друзы, встречаются редко.

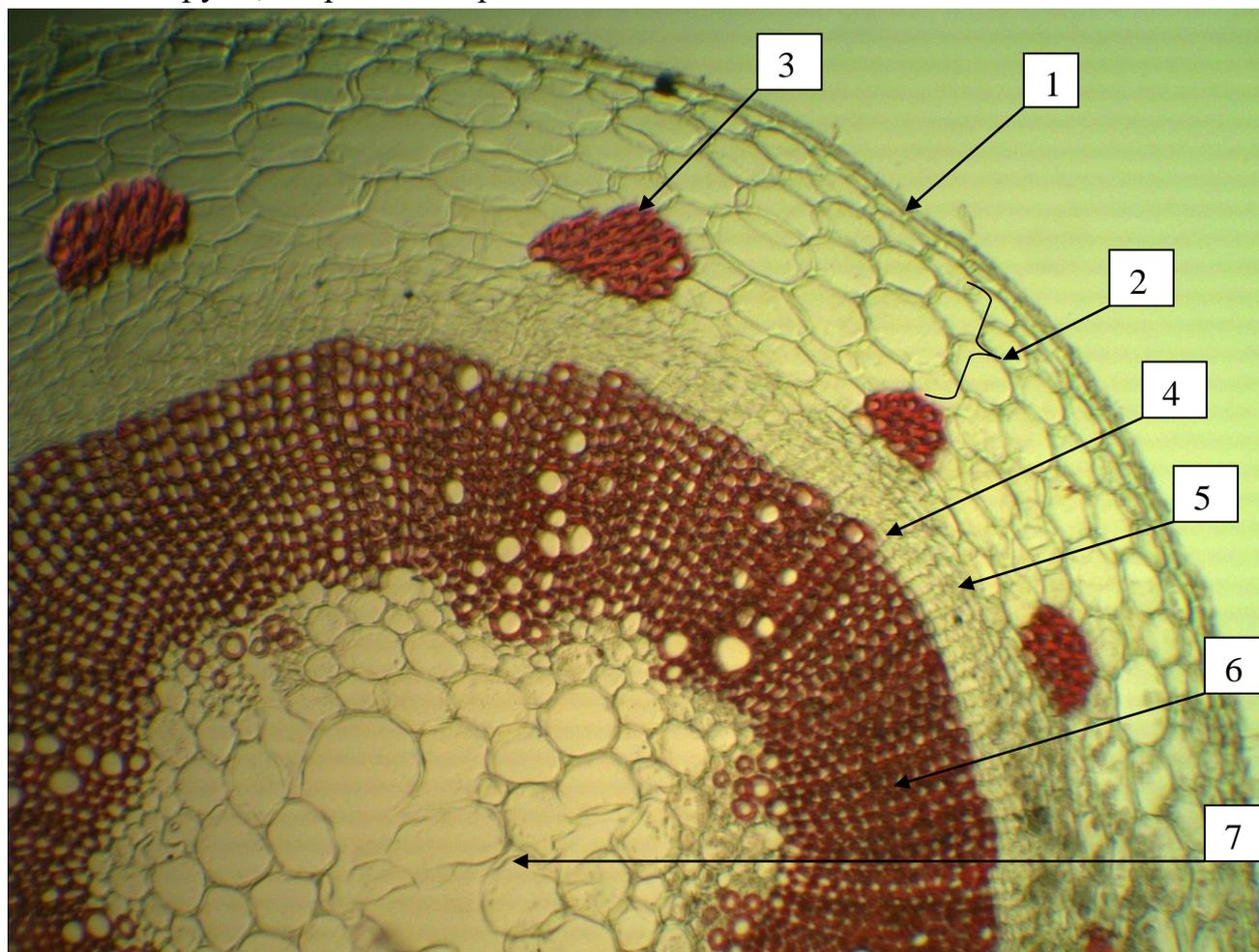


Рис.7. Общий вид поперечного среза стебля якорцев стелющихся:

1 – эпидермис, 2 – первичная кора, 3 – перикцикл, 4 – камбий, 5 – флоэма, 6 – ксилема,
7 – сердцевина

1.3. Анатомическое строение цветка

Клетки венчика многоугольные, изодиаметрические. Эпидермис чашелистиков состоит из клеток со слегка волнистыми стенками, расположенными близко друг к другу, покрыты гладкой кутикулой. В структуре чашелистиков присутствуют устьица аномоцитного типа, многочисленные одноклеточные волоски разной длины расположены по поверхности чашелистика и по его краю. В препаратах цветков обнаружена пыльца сферической формы и друзы оксалата кальция (рис.8).

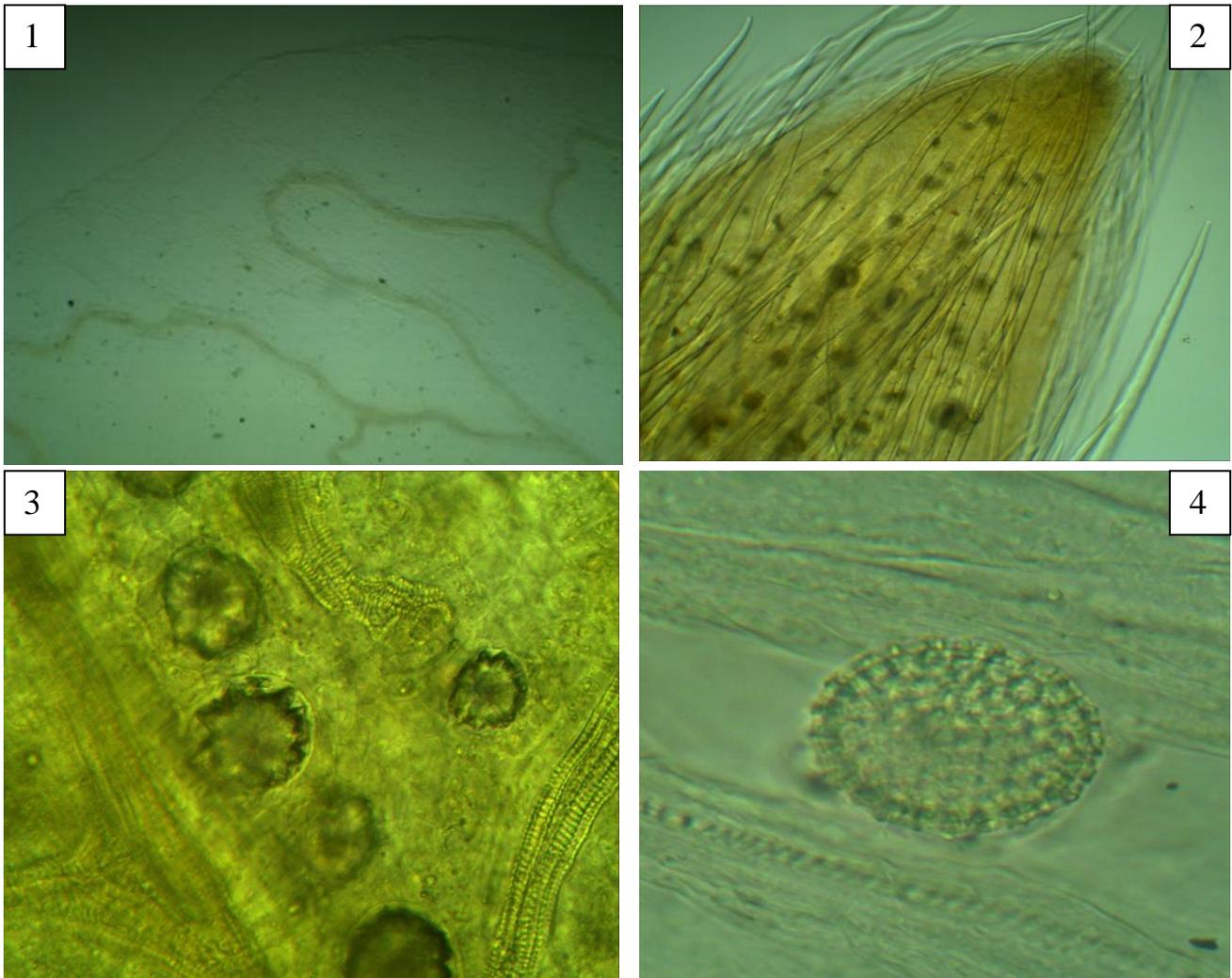


Рис.8. Цветок якорцев стелющихся: 1 – лепесток венчика, 2 – чашелистик, опушенный волосками, 3 – чашелистик с друзами, 4 – пыльца.

1.4. Анатомическое строение корня

Корень (рис.9) покрыт тонким слоем перидермы. Во вторичной коре находятся большие группы клеток склеренхимы и небольшое количество паренхимы. Клетки паренхимы прямоугольной формы с извилистым контуром. Проводящая система непучкового строения состоит из вторичной флоэмы, камбия и более широкой зоны вторичной ксилемы. Кристаллы оксалата кальция – друзы располагаются в корковой зоне корня.

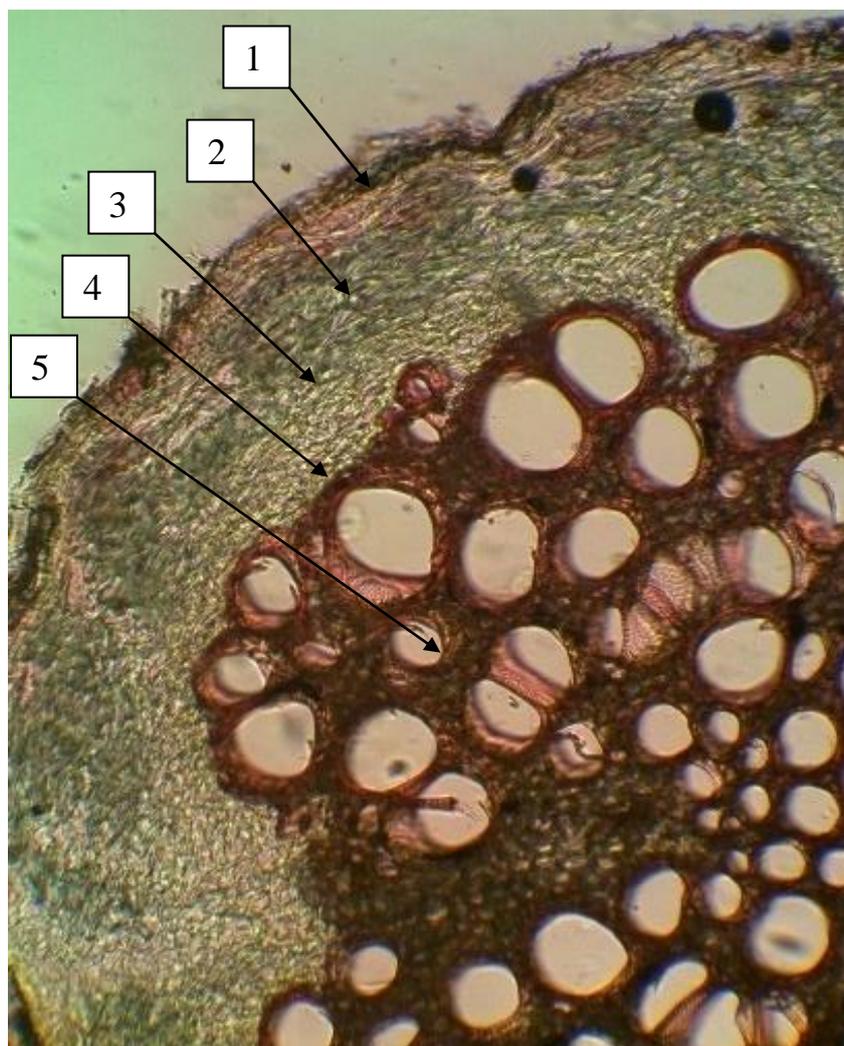


Рис.9. Общий вид поперечного среза корня якорцев стелющихся: 1 – перидерма, 2 – вторичная кора, 3 – вторичная флоэма, 4 – камбий, 5 – вторичная ксилема.

Нами выявлены основные анатомо – морфологические признаки якорцев стелющихся травы: простые одноклеточные волоски на листьях и чашелистиках; непучковый тип проводящей системы стеблей и корней; наличие друз во всех органах растения.

Определены основные биометрические параметры анатомических признаков:

- листа: простые волоски длиной от $117,33 \pm 10,90$ мкм до $890,53 \pm 29,78$ мкм и шириной от $10,80 \pm 0,48$ мкм до $18,27 \pm 0,46$ мкм; клетки эпидермы длиной от $20,90 \pm 0,78$ мкм до $42,00 \pm 3,18$ мкм и шириной от $13,97 \pm 0,55$ мкм до $30,53 \pm 2,64$ мкм; устьица длиной от $16,30 \pm 0,60$ мкм до $21,86 \pm 0,75$ мкм и шириной от $13,37 \pm 0,39$ мкм до $18,66 \pm 0,90$ мкм; друзы диаметром от $21,31 \pm 1,24$ мкм до $34,50 \pm 2,91$ мкм.
- стебля: толщина первичной коры от $83,20 \pm 5,06$ мкм до $200,00 \pm 9,26$ мкм; толщина перицикла от $78,40 \pm 5,73$ мкм до $122,40 \pm 4,69$ мкм; толщина флоэмы от $26,66 \pm 2,75$ мкм до $119,00 \pm 13,08$ мкм; толщина ксилемы от

225,20 ± 14,94 мкм до 274,93 ± 24,88 мкм; друзы диаметром от 24,33 ± 1,78 мкм до 31,53 ± 1,50 мкм; радиус стебля от 958,00 ± 50,16 мкм до 1752,00 ± 149,86 мкм.

- цветка: волоски по поверхности чашелистика длиной от 351,26 ± 41,21 мкм до 717,07 ± 58,37 мкм и шириной от 11,70 ± 0,71 мкм до 28,32 ± 1,65 мкм; волоски по краю чашелистиков длиной от 202,53 ± 17,65 мкм до 481,04 ± 57,83 мкм и шириной от 9,47 ± 0,65 мкм до 19,10 ± 1,17 мкм; друзы диаметром от 13,91 ± 0,81 мкм до 24,07 ± 1,35 мкм; пыльца диаметром от 41,60 ± 1,28 мкм до 46,60 ± 1,59 мкм; клетки эпидермы длиной от 28,10 ± 1,86 мкм до 49,67 ± 2,71 мкм и шириной от 14,87 ± 1,05 мкм до 19,60 ± 1,00 мкм; устьица длиной от 18,83 ± 0,34 мкм до 20,80 ± 0,82 мкм и шириной от 13,13 ± 0,70 мкм до 19,60 ± 0,72 мкм.
- корня: толщина перидермы от 44,13 ± 3,52 мкм до 145,63 ± 18,38 мкм; толщина коры от 319,47 ± 14,80 мкм до 573,77 ± 44,29 мкм; толщина ксилемы от 520,53 ± 37,77 мкм до 1714,00 ± 121,10 мкм; радиус корня от 995,33 ± 28,34 мкм до 2801,00 ± 117,46 мкм; друзы диаметром от 22,07 ± 1,61 мкм до 27,40 ± 1,19 мкм.

2. Фитохимический анализ якорцев стелющихся травы

На основании проведенных качественных реакций нами подтверждено наличие сапонинов, флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, следов алкалоидов.

Присутствие сапонинов (диосцин и протодиосцин) подтверждали методом ВЭЖХ. Определение проводили на базе РИЦ «Фарматест» ФГБОУ ВО ПГФА МЗ РФ, под руководством доцента Карпенко Ю.Н.

Идентификацию диосцина и протодиосцина на хроматограммах проводили по временам удерживания в сравнении со стандартными образцами. Времена удерживания протодиосцина и диосцина составили соответственно 4,93 ± 0,03 и 8,86 ± 0,03 мин. (рис.10 – 12). Кроме качественного определения методом ВЭЖХ проводили количественную оценку сапонинов в растительном сырье. Для этого использовали метод внешнего стандарта. Содержание диосцина в исследуемых образцах колеблется в пределах 0,09 – 1,90 мг, а содержание протодиосцина 1,44 – 15,59 мг.

Присутствие флавоноидов, кроме качественных реакций, подтверждали методом ТСХ. Для разделения флавоноидов мы подбирали условия хроматографирования.

- Plates for Thin Layer Chromatography – хроматографические пластинки ПТСХ-П-А-УФ аналитические марки Sorbfil (100x150 мм), сорбент силикагель СТХ-1А, подложка – полиэтилентерефталат.

- Пластинки для тонкослойной хроматографии Silufol, сорбент Silpearl – широкопористый силикагель с люминисцентным индикатором, подложка – алюминиевая фольга.
- Объем 0,02 – 0,1 мл.
- Системы растворителей:
 1. 15 % раствор уксусной кислоты
 2. Уксусная кислота – бутанол – вода (4:1:5)
 3. Этилацетат – метанол (8:2)
 4. Этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода (60:12:18)
 5. Этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода (26:6:8)
 6. Этилацетат – муравьиная кислота безводная – вода (80:20)
 7. Этилацетат – метанол – вода (30:6:3)
 8. Этилацетат – метанол – вода (1:2:1)
 9. Этилацетат – муравьиная кислота безводная – хлороформ (2:1:2)
 10. Муравьиная кислота безводная – вода – этилацетат (10:10:80)
 11. Этилацетат – уксусная кислота – вода (70:10:20)

Флавоноиды якорцев стелющихся лучше разделяются на пластинке Silufol, сорбент Silpearl – широкопористый силикагель с люминисцентным индикатором, подложка – алюминиевая фольга в системе растворителей муравьиная кислота безводная – вода – этилацетат (10:10:80). Поэтому данная система была предложена нами для хроматографического определения флавоноидов. Оптимальный объем наносимого извлечения 0,02 мл.

Идентификацию флавоноидов проводили со стандартным образцом рутина. Хроматограмму проявляли алюминия хлорида раствором 2 % в 96 % спирте. После высушивания флавоноиды обнаруживали в УФ – свете по желто – зеленой флуоресценции на уровне стандартного образца рутина ($R_f = 5,83$) (рис. 13).

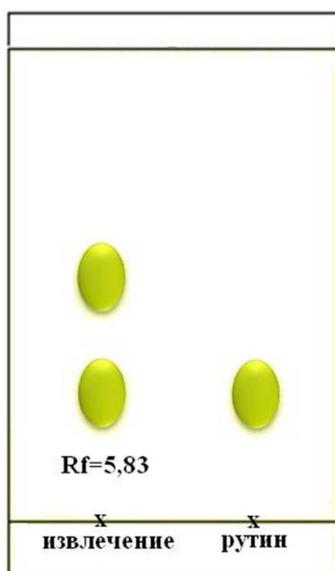


Рис.13. Схема хроматограммы извлечения из якорцев стелющихся травы.

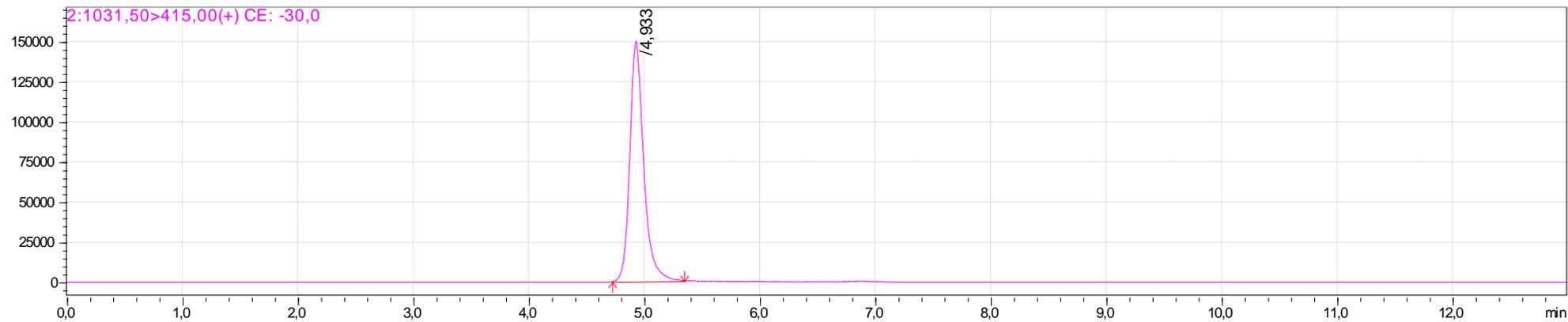


Рис. 10. Хроматограмма раствора стандартного образца протодиосцина (1333 нг/мл).

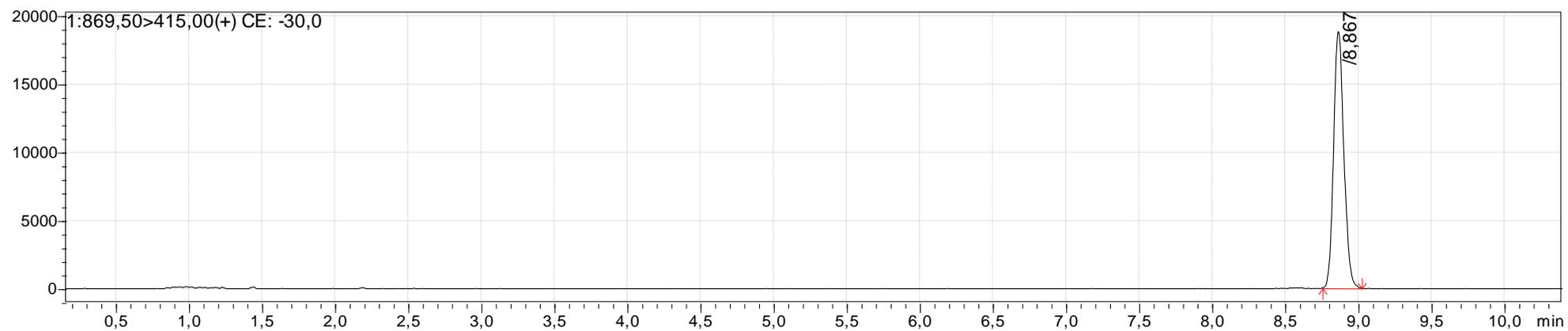


Рис. 11. Хроматограмма раствора стандартного образца диосцина (900 нг/мл).

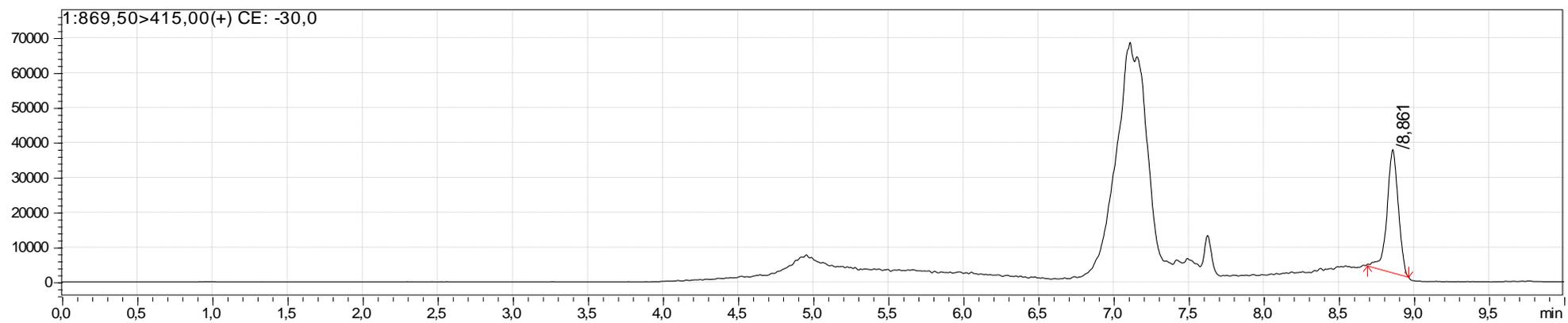
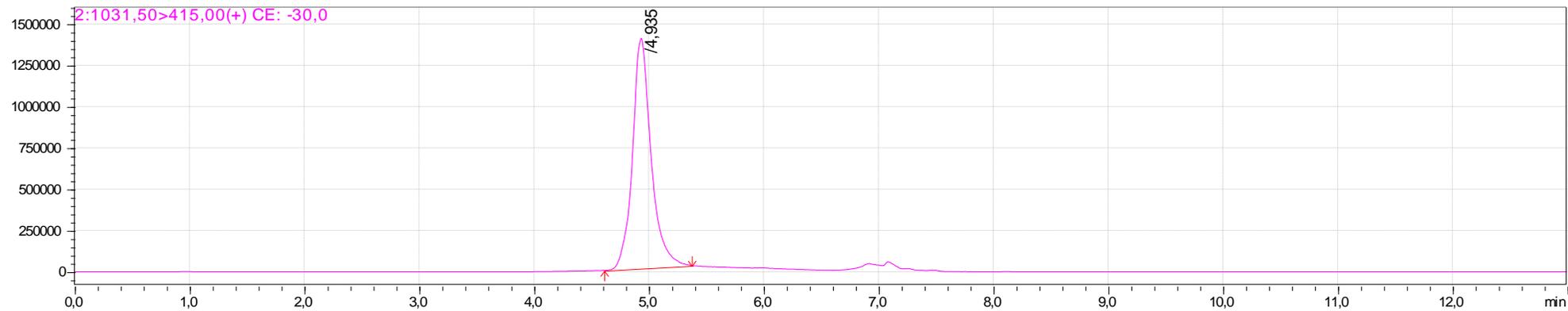


Рис. 12. Хроматограммы раствора исследуемых образцов, протодиосцин (верхний), диосцин (нижний)

3. Исследование элементного состава

Макро и микроэлементный состав якорцев стелющихся представлен 20 элементами (табл. 1).

Таблица 1

Элементный состав якорцев стелющихся травы

№ п/п	Элемент	% от общего содержания элементов в образцах, в пересчете на воздушно-сухое сырье			
		Сирия (2018)	Крым (2017)	Молдова (2017)	ВИЛАР (2016)
Макроэлементы					
1	Na	7,7 ± 0,154	3,2 ± 0,255	3,5 ± 0,6	4,3 ± 0,211
2	K	50,708 ± 0,562	64,65 ± 0,386	63,97 ± 0,3	36,273 ± 0,42
3	Mg	0,47 ± 0,089	0,498 ± 0,056	0,576 ± 0,042	0,314 ± 0,01
4	P	0,696 ± 0,1	0,878 ± 0,098	0,876 ± 0,08	0,345 ± 0,04
5	S	1,433 ± 0,132	1,0989 ± 0,124	1,0833 ± 0,2	1,023 ± 0,111
6	Ca	37,830 ± 0,542	27,22 ± 0,231	26,982 ± 0,214	46,594 ± 0,35
Микроэлементы					
7	Cu	0,0323 ± 0,001	0,0163 ± 0,004	0,0176 ± 0,001	0,01811 ± 0,002
8	Zn	0,0685 ± 0,008	0,0959 ± 0,007	0,0738 ± 0,003	0,0536 ± 0,011
9	Al	0,6 ± 0,079	0,628 ± 0,048	0,736 ± 0,045	1,555 ± 0,124
10	Si	0,458 ± 0,058	0,656 ± 0,072	0,957 ± 0,043	0,908 ± 0,062
11	Ti	0,0559 ± 0,001	0,1337 ± 0,007	0,1431 ± 0,008	0,630 ± 0,075
12	Cr	0	0	0,0075 ± 0,002	0,016 ± 0,001
13	Mn	0,0459 ± 0,01	0,0648 ± 0,004	0,0672 ± 0,008	0,2146 ± 0,008
14	Fe	0,3556 ± 0,088	0,8804 ± 0,07	0,9616 ± 0,054	0,4736 ± 0,045
15	Co	0	0	0	0
16	Ni	0,0038 ± 0,002	0	0	0,011 ± 0,001
17	Pb	0	0	0	0,0112 ± 0,003
18	Mo	0	0	0	0
19	Sn	0	0	0	0
20	Ba	0	0	0	0

В результате элементного анализа образцов якорцев стелющихся травы установлено, что среди макроэлементов во всех исследуемых образцах в наибольшем количестве накапливаются калий и кальций, на их долю приходится около 90 % от общего содержания элементов в растении. В траве якорцев стелющихся присутствуют эссенциальные элементы, без которых организм не может нормально расти и развиваться, такие как: железо, медь, цинк, марганец, хром, молибден.

Распределение макро и микроэлементов в растении существенно различается в зависимости от места и условий произрастания.

С учетом полученных данных составлены ряды биологического поглощения для образцов каждого места произрастания.

Образец, заготовленный в Сирии (2018 г):

K>Ca>Na>S>P>Al>Mg>Si>Fe>Zn>Ti>Mn>Cu>Ni.

Образец, заготовленный на полуострове Крым (2017 г):

K>Ca>Na>S>Fe>P>Si>Al>Mg>Ti>Zn>Mn>Cu.

Образец, заготовленный в Молдове (2017 г):

K>Ca>Na>S>Fe>Si>P>Al>Mg>Ti>Zn>Mn>Cu>Cr.

Образец, заготовленный на питомнике ВИЛАР (2016 г):

Ca>K>Na>Al>S>Si>Ti>Fe>P>Mg>Mn>Zn>Cu>Cr>Pb>Cu.

4. Стандартизация якорцев стелющихся травы

С целью определения качества сырья мы определили товароведческие показатели: влажность, зола общая, зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте, содержание сапонинов, содержание суммы флавоноидов и экстрактивные вещества.

Влажность в исследуемых образцах колеблется в пределах 5,90 – 7,60 %, что не превышает допустимую норму 13 %.

Содержание *зола общей* колеблется в пределах 12,98 – 14,83 %, что не превышает допустимую норму 16 %.

Нами предложен показатель «*Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте*», так как трава якорцев стелющихся имеет опушение и собирают сырье с корнями. Результаты определения представлены в таблице 2.

Таблица 2

Содержание зола нерастворимой в хлористоводородной кислоте

Образец	Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте, %
ВИЛАР, 2016 г	1,41 ± 0,10
Молдова, 2017 г	0,99 ± 0,08
Крым, 2017 г	0,68 ± 0,02
Сирия, 2018 г	1,03 ± 0,02
Сирия, 2019 г	1,05 ± 0,12
Крым, 2019 г	0,20 ± 0,04

На основании полученных данных, считаем необходимым нормировать показатель: «Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте» – «Цельное сырьё, измельчённое сырьё – не более 1,5 %».

Количественное определение суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве

Для количественного определения суммы флавоноидов в сырье применяли метод спектрофотометрии.

При разработке методики количественного определения суммы флавоноидов использовали реакцию комплексообразования с раствором алюминия хлорида 2 % в 96 % спирте.

Предварительно при регистрации спектра поглощения комплекса флавоноидов якорцев стелющихся травы с раствором алюминия хлорида 2 % в 96 % спирте установили, что область максимального светопоглощения равна 410 ± 2 нм, что соответствует максимуму поглощения комплекса рутина с раствором алюминия хлорида 2 % в 96 % спирте (рис. 14,15).

Определено, что оптимальным экстрагентом является спирт – 80 %, соотношение «сырьё – экстрагент» – 3:100.

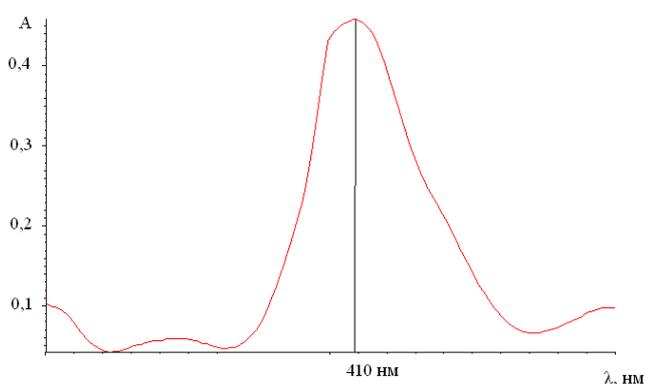


Рис. 14. УФ – спектр извлечения комплекса суммы флавоноидов якорцев стелющихся травы с раствором алюминия хлорида 2 % в 96 % спирте.

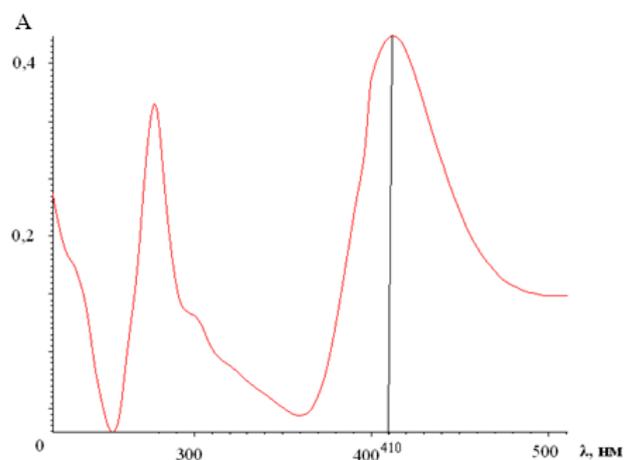


Рис. 15. УФ – спектр комплекса раствора СО рутина с раствором алюминия хлорида 2 % в 96 % спирте.

При разработке методики количественного определения суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве были определены параметры: длина волны – 410 нм, экстрагент – 80 % спирт, однократная экстракция, время экстракции – 60 минут, измельченность сырья – 2 мм, навеска – 3 г, оптимальное соотношение объема извлечения и 2 % спиртового раствора алюминия хлорида – 2:5, время образования устойчивого комплекса – 15 минут.

По разработанной методике определено содержание суммы флавоноидов в исследуемых образцах (табл.3, рис.16).

Таблица 3

Содержание суммы флавоноидов в исследуемых образцах

Образец	Сумма флавоноидов, %
ВИЛАР, 2016 г	1,67 ± 0,06
Молдова, 2017 г	1,36 ± 0,02
Крым, 2017 г	1,25 ± 0,02
Сирия, 2018 г	1,23 ± 0,08
Сирия, 2019 г	1,18 ± 0,04
Крым, 2019 г	1,22 ± 0,04

Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95 % составляет ± 2,89 % (табл.4).

Таблица 4

Метрологическая характеристика метода

n	f	\bar{x}	S ²	S	P,%	t(p,f)	$\Delta\bar{x}$	ϵ	$\delta, \%$
5	4	2,086	0,0596	0,2441	95	2,78	0,03	0,77	2,89

Количественное определение сапонинов в якорцах стелющихся траве

Количественное определение сапонинов проводили по общеизвестной методике. Данные представлены в таблице 5, рисунок 16.

Таблица 5

Содержание фураностаноловых гликозидов в образцах

Образец	Фураностаноловые гликозиды, %	по НД
ВИЛАР, 2016 г	0,85 ± 0,04	не менее 0,7 %
Молдова, 2017 г	0,95 ± 0,08	
Крым, 2017 г	0,88 ± 0,10	
Сирия, 2018 г	1,01 ± 0,06	
Сирия, 2019 г	1,02 ± 0,02	
Крым, 2019 г	0,84 ± 0,04	

Содержание сапонинов в исследованных образцах якорцев стелющихся составило от $0,84 \pm 0,04$ до $1,02 \pm 0,02$ %.

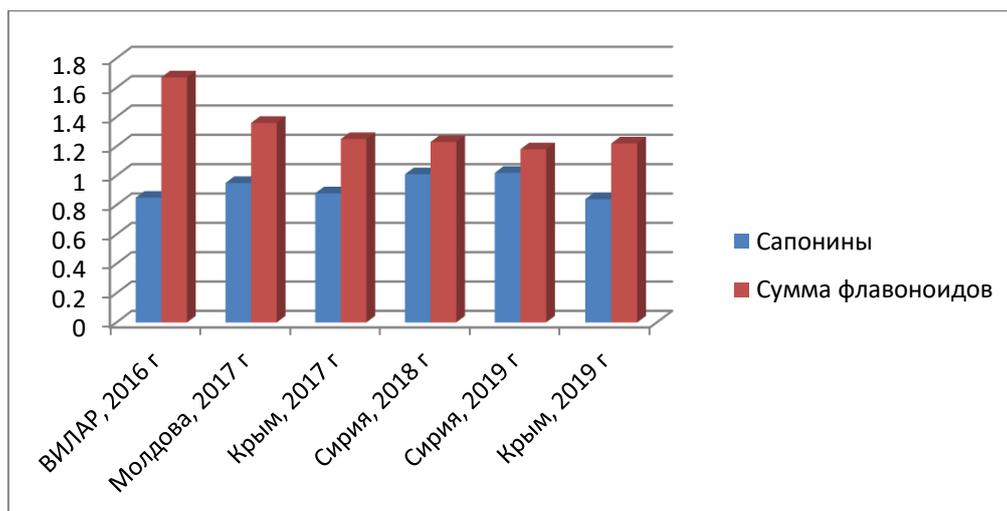


Рис. 16. Содержание сапонинов и суммы флавоноидов в образцах якорцев стелющихся травы.

Количественное определение экстрактивных веществ в якорцах стелющихся траве

Так как якорцев стелющихся трава используется для получения сухого экстракта, нами был изучен показатель «Содержание экстрактивных веществ с использованием различных экстрагентов: воды очищенной, спирта 50, 70, 80, 90 – процентной концентрации (табл.6).

Таблица 6

Выбор экстрагента для определения содержания экстрактивных веществ

№	Экстрагент	Содержание экстрактивных веществ, %
1	Вода очищенная	$25,28 \pm 0,05$
2	спирт 50 %	$26,79 \pm 0,03$
3	спирт 70 %	$24,12 \pm 0,09$
4	спирт 80 %	$22,36 \pm 0,04$
5	спирт 90 %	$16,81 \pm 0,09$

Установлено, что максимальное количество экстрактивных веществ, извлекается 50 % спиртом. В исследуемых образцах определено содержание экстрактивных веществ (табл.7, рис.17).

Таблица 7

Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 50 % спиртом

Образец	Содержание экстрактивных веществ, %
Крым, 2017 г	22,58 ± 0,04
Молдова, 2017 г	22,06 ± 0,03
ВИЛАР, 2016 г	16,62 ± 0,07
Сирия, 2018 г	16,13 ± 0,04
Сирия, 2019 г	25,75 ± 0,05
Крым, 2019 г	30,12 ± 0,03

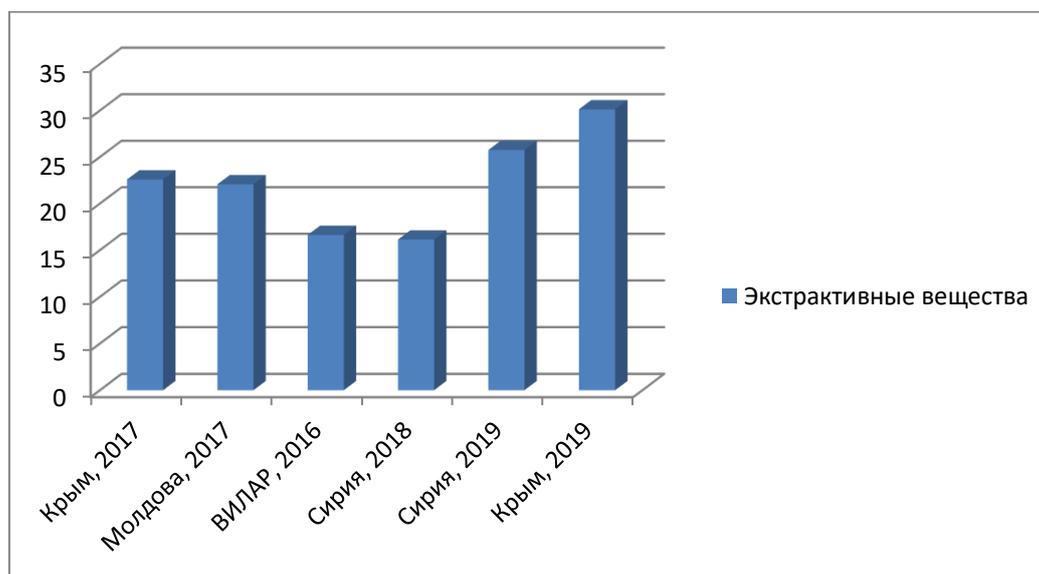


Рис. 17. Содержание экстрактивных веществ в образцах якорцев стелющихся травы.

Содержание экстрактивных веществ в исследованных образцах якорцев стелющихся составило от $16,13 \pm 0,04$ до $30,12 \pm 0,03$ %. Исходя из этого, предлагаем нормировать показатель количественного содержания экстрактивных веществ: *Цельное сырьё, измельченное сырьё*: содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 50 % спиртом – не менее 16 %.

ВЫВОДЫ

1. Проведено морфолого – анатомическое исследование, которое позволило выявить основные анатомо – морфологические признаки якорцев стелющихся травы: простые одноклеточные волоски на листьях и чашелистиках; непучковый тип проводящей системы стеблей и корней; наличие друз во всех органах растения.
2. Определены основные биометрические параметры анатомических признаков. Выполнены микрофотографии.

3. Подтверждено наличие сапонинов, флавоноидов, фенолкарбонновых кислот и алкалоидов методами ТСХ и с помощью качественных химических реакций.
4. Доказано наличие диосцина и протодиосцина в исследуемых образцах методом ВЭЖХ – МС/МС, их содержание колеблется в пределах: диосцин $0,09 \pm 0,02 - 1,90 \pm 0,02$ мг; протодиосцин $1,44 \pm 0,38 - 15,59 \pm 0,28$ мг.
5. Определен элементный состав *Tribulus terrestris* L. Он представлен 16 элементами, из них 6 макроэлементов (Na, K, Mg, P, S, Ca) и 10 микроэлементов (Cu, Zn, Al, Si, Ti, Cr, Mn, Fe, Ni, Pb), составлены ряды биологического поглощения для образцов каждого места произрастания. Доказано влияние мест обитания (географические зоны) на накопление элементов растением.
6. Разработана методика и определены параметры количественного определения суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве в пересчете на рутин с использованием дифференциальной спектрофотометрии: длина волны – 410 нм, экстрагент – 80 % спирт, время однократной экстракции – 60 минут, измельченность сырья – 2 мм, оптимальное соотношение объема извлечения и 2 % спиртового раствора алюминия хлорида – 2:5, время образования устойчивого комплекса – 15 минут. Доказано, что методика является валидной, что позволяет использовать ее для достоверной оценки качества сырья.
7. Проведена стандартизация сырья якорцев стелющихся по показателям: влажность ($5,90 \pm 0,02 - 7,60 \pm 0,04\%$), зола общая ($11,01 \pm 0,04 - 14,83 \pm 0,02\%$), содержание сапонинов ($0,84 \pm 0,04 - 1,02 \pm 0,02$ %), содержание суммы флавоноидов, в пересчете на рутин ($1,18 \pm 0,04 - 1,67 \pm 0,06$ %), экстрактивных веществ, извлекаемых 50% спиртом ($16,13 \pm 0,04 - 30,12 \pm 0,03$ %).
8. Предложены показатели «Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте», не более 1,5 %; экстрактивных веществ, извлекаемых 50 % спиртом – не менее 16 %; содержание суммы флавоноидов, в пересчете на рутин, не менее 1 %.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Аффиф Абдулкарим Фитохимическое исследование травы якорцев стелющихся / Абдулкарим Аффиф, Ю.Н. Карпенко, Д.К. Гуляев, В.Д. Белоногова, Е.И. Молохова, О.Л. Блинова, А.А. Гилева // Фармация и фармакология. – 2019;7(6):346 – 355.
2. Аффиф Абдулкарим Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве/ Аффиф Абдулкарим, Гилева А.А, Блинова О.Л., Белоногова В.Д., Турышев А.Ю.// Фармация, 2020. – Т. 69, № 1. – С. 17 – 22.
3. Анисимова А.Г. Морфолого-анатомическое исследование якорцев стелющихся травы/ А.Г. Анисимова, О.Л. Блинова, В.Д. Белоногова, Абдулкарим Аффиф //

- Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. - №3 (25) 2019. – С. 26-35.
4. Аффиф Абдулкарим. Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в якорцах стелющихся траве/ Аффиф Абдулкарим, Блинова О.Л., Гилева А.А, Белоногова В.Д., Турышев А.Ю.// Фармация.- 2020.- Т. 69. – С. 18-23.
 5. Аффиф А. Определение основных групп биологически активных веществ якорцев стелющихся травы А. Аффиф, О.Л. Блинова, А.А. Гилева, В.Д. Белоногова // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии: научно-практический журнал. – Пермь: ПГФА, 2019. - № 24. – С. 115 – 118.
 6. Affouf Abdulkarim Research on comprehensive quality assessment of tribulus terrestris grass/ Abdulkarim Affouf, Olga Leonidovna Blinova, Valentina Dmitrievna Belonogova //International Conference “Scientific research of the SCO countries: synergy and integration”. - September 14, 2019. Beijing, PRC.–P.136-139.
 7. Аффиф Абдулкарим Башар Современные хроматографические методы определения стероидных сапонинов (обзор методик) / Аффиф Абдулкарим Башар // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии: научно-практический журнал. – Пермь: ПГФА, 2018. - № 21. – С. 190 – 191.
 8. Молохова, Е.И. Выбор условий масс-спектрометрического детектирования диосцина в экстракционных препаратах и Tribulus terrestris L. / Е.И. Молохова, Ю.Н. Карпенко, А. Аффиф // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. Материалы науч. – практ. конф. с междунар. участием (13.12.2018 г.): Создание конкурентоспособных лекарственных средств – приоритетное направление развития фармацевтической науки, посвященная 100-летию кафедр: фармакогнозии, фармацевтической технологии, фармфармацевтической химии. – Пермь: ПГФА, 2018. - №22. – С. 158 – 161.
 9. Аффиф А. Сравнительный морфологический анализ Tribulus terrestris herba, заготовленной в России и Сирийской арабской республике А. Аффиф, О.Л. Блинова, В.Д. Белоногова // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии: научно-практический журнал. – Пермь: ПГФА, 2020. - № 25. – С. 165 – 167.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БАВ – биологически активные вещества
ВФС – временная фармакопейная статья
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ГФ – государственная фармакопея
MRM – мониторинг множественных реакций
ОФС – общая фармакопейная статья
СО – стандартный образец
ТСХ – тонкослойная хроматография