

Иванцова Любовь Витальевна

**Фармакогностическое исследование, стандартизация персика обыкновенного
листьев и разработка экстракта густого на его основе**

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата фармацевтических наук

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**

Научный консультант:

доктор фармацевтических наук, профессор – **Молохова Елена Игоревна**

Официальные оппоненты:

Марахова Анна Игоревна - доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов», Институт биохимической технологии и нанотехнологии, профессор;

Пупыкина Кира Александровна - 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 «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Новосибирск.

Защита диссертации состоится 26 мая 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 2, тел/факс (342)233-55-01.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (614070, г. Пермь, ул. Крупской, 46 и на сайте <http://www.pfa.ru>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г

Учёный секретарь диссертационного совета
Д 208.068.02, кандидат химических наук

Замараева Татьяна Михайловна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Фитопрепараты широко используются для применения, как в народной, так и официальной медицине, что указывает на их важность для профилактики и лечения заболеваний (Е.А. Никитина, 2011 г; V.K. Knudsen, 2002 г; S.H. Kim, 2003 г). Такая популярность обусловлена рядом факторов: мягкое и безопасное действие при рациональном использовании; возможность длительного назначения для лечения хронических заболеваний; комплексное действие биологически активных веществ (БАВ), минимальное проявление аллергических реакций (С.М. Николаев, 2012 г; D.D. Hensrud, 1999).

Под влиянием неблагоприятных экологических факторов, повышенных физических и эмоциональных нагрузок, а также при длительных заболеваниях и в процессе старения свободно радикальное окисление в организме человека активизируется – развивается, так называемый, синдром пероксидации или окислительный стресс (Н.К. Зенков, 2001 г). При этом свободные радикалы оказывают повреждающее воздействие на мембраны клеток, в организме нарушаются процессы обмена веществ, накапливаются различные продукты промежуточного обмена. Такие сдвиги нарушают работу центральной нервной системы, иммунной системы, усугубляют воспалительные процессы в организме, способствуют образованию атеросклеротических бляшек в коронарных и мозговых сосудах, и ускоряют старение организма (Е.Б. Бурлакова, 1992 г). Для замедления этих процессов целесообразно использовать лекарственные средства, обладающие антиоксидантными свойствами.

В связи с этим, одной из актуальных проблем современной фармации является поиск лекарственных растений, обладающих достаточной сырьевой базой и широким спектром фармакологической активности, включая антиоксидантную (А.В. Яницкая, 2015 г). С этой точки зрения, перспективными являются плодово-ягодные растения, в том числе, персик обыкновенный.

В китайской народной медицине издавна применяют персик для профилактики и лечения многих заболеваний. В плодах персика отмечено высокое содержание калия в составе мякоти, поэтому фрукты полезны лицам с сердечно-сосудистыми заболеваниями. Сок и мякоть плодов полезны для детей, истощенных больных (Г.А. Гарбузов, 2012 г). Отвары из листьев персика помогают при ревматических, головных болях, некоторых желудочно-кишечных заболеваниях, гастритах, запорах. В настоящий момент персика обыкновенного листьев используют в составе биологически активных добавок к пище. Однако, исследования фитохимического состава и стандартизация исходного сырья ранее не проводилась. Поэтому, фармакогностическое исследование и стандартизация персика обыкновенного листьев, разработка проекта фармацевтической статьи (ФС) «Персика обыкновенного листьев», а также создание экстракта, является актуальной задачей.

Степень разработанности темы. Опубликован ряд исследований, посвященных разработке биологически активных добавок (БАД) к пище, на основе персика обыкновенного листьев экстракта жидкого.

Однако, оценка качества БАД к пище проводилась согласно технической документации, разработанной их производителями. Данные нормативные документы не предусматривают оценку качества исходного сырья, что имеет большое значение для получения высококачественной продукции. Кроме того, существующие БАД к пище включают персика обыкновенного листьев экстракт жидкий, в качестве экстрагента в которых используется как вода очищенная, так и спирт этиловый 96%. Данные экстрагенты не учи-

тывают физико-химических свойств действующих веществ сырья, и не позволяют извлечь весь комплекс БАВ.

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является фитохимическое изучение и стандартизация персика обыкновенного листьев с перспективой дальнейшей разработки технологии экстракционного препарата.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

- провести морфолого-анатомическое изучение персика обыкновенного листьев;
- определить товароведческие показатели персика обыкновенного листьев;
- разработать методику количественного определения суммы флавоноидов персика обыкновенного листьев и провести ее валидацию;
- провести исследование качественного состава биологически активных веществ (БАВ), количественного содержания дубильных веществ, каротиноидов, аскорбиновой кислоты, элементного состава персика обыкновенного листьев;
- разработать технологию экстракционного препарата на основе персика обыкновенного листьев и оценить его качество;
- определить острую токсичность, фармакологическую активность персика обыкновенного листьев экстракта густого;
- разработать: проект фармакопейной статьи (ФС) на новый вид лекарственного сырья – «Персика обыкновенного листа», «Инструкцию по сбору и сушке персика обыкновенного листьев», НД предприятия ООО «Апифитофарм» (г. Пермь) на производство персика обыкновенного листьев экстракт густой - ТУ «Персика обыкновенного листьев экстракт густой».

Научная новизна работы.

1. Впервые проведено фармакогностическое исследование и стандартизация персика обыкновенного листьев. На основании макро – и микроскопического анализа определены диагностически значимые признаки персика обыкновенного листьев для установления подлинности сырья.

2. Подобраны оптимальные условия качественного и количественного анализа БАВ, и разработаны нормы качества и методики контроля в сырье и экстракте густом.

3. В персике обыкновенном листьях и экстракте густом из них определено количественное содержание макро- и микроэлементов, среди которых наибольшее содержание в листьях приходится на калий и кальций, в экстракте густом – на калий и натрий.

4. Разработана технология персика обыкновенного листьев экстракта густого, с учетом физико-химических свойств действующих веществ сырья, с целью получения субстанции с максимальным содержанием БАВ.

5. Определены показатели качества персика обыкновенного листьев и персика обыкновенного листьев экстракта густого.

Теоретическая и практическая значимость работы

Результаты проведенных исследований расширяют представление о химическом составе, морфолого-анатомических признаках, фармакологической активности персика обыкновенного листьев.

На основе проведенных исследований разработан проект НД: фармакопейная статья (ФС) на новый вид лекарственного сырья – «Персика обыкновенного листа», «Инструкция по сбору и сушке персика обыкновенного листьев». Проект НД с обоснованием спецификации, отправлен для экспертизы и регистрации в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Минздрава России.

Разработаны, утверждены и апробированы нормативные документы предприятия ООО «Апифитофарм»:

- технические условия (ТУ) «Персика обыкновенного листьев экстракт густой»;
- лабораторный регламент «Производство персика обыкновенного листьев экстракта густого».

На основании проведенных исследований разработана и внедрена методика количественного определения суммы флавоноидов в персике обыкновенного листьях (акты внедрения в работу ООО «Апифитофарм», г. Пермь от 01.12.2019; ООО «НПП «Укрпроминвест-05», г. Киев от 20.01.2020; ООО «НПК «Лаборатория красоты и здоровья», Московская обл., г. Протвино от 20.01.2020).

Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс кафедры фармакогнозии с курсом ботаники ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России (акт внедрения от 09.01.2020) и кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России (акт внедрения от 14.10.2019).

Методология и методы диссертационного исследования. Методология построена на изучении и обобщении данных отечественных и зарубежных авторов по фармакогностическому изучению персика обыкновенного листьев, оценке степени разработки и актуальности указанной темы. В соответствии с поставленной целью и задачами был разработан план диссертационного исследования, выбраны объекты и методы.

В качестве объектов исследования использовались персика обыкновенного листа, заготовленные в Краснодарском крае, в 2015-2017 гг., персика обыкновенного листьев экстракт густой, серии 001,002, 003, 004, 005. Исследования проводили с использованием физических, физико-химических, химических, макро- и микроскопических методов анализа (тонкослойной хроматографии (ТСХ), бумажной хроматографии, спектрофотометрии, высокоэффективной жидкостной хроматографии, элементного анализа, качественных реакций). Стандартизацию сырья, полученной субстанции и статистическую обработку данных проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV издания.

Положения, выносимые на защиту.

1. Данные морфологического и анатомического изучения персика обыкновенного листьев.
2. Показатели фитохимического исследования БАВ персика обыкновенного листьев.
3. Результаты количественного анализа БАВ персика обыкновенного листьев.
4. Параметры стандартизации персика обыкновенного листьев, проект ФС «Персика обыкновенного листа».
5. Показатели по разработке технологии персика обыкновенного листьев экстракта густого.
6. Данные исследований по стандартизации персика обыкновенного листьев экстракта густого, ТУ «Персика обыкновенного листьев экстракт густой», лабораторный регламент «Производство персика обыкновенного листьев экстракта густого».
7. Результаты исследования токсичности, фармакологической активности персика обыкновенного листьев экстракта густого.

Степень достоверности. Научные положения и выводы диссертации базируются на достаточном объеме экспериментальных исследований и применении современных физико-химических, химических, фармакогностических, технологических, фармакологических методов исследования, позволяющих получать достоверные и воспроизводимые результаты.

Результаты исследований обработаны статистически, и представлены в виде таблиц, рисунков в тексте диссертации и приложениях.

Апробация результатов. Основные результаты диссертационной работы доложены на следующих научно-практических конференциях: Пермской государственной фармацевтической академии «Создание конкурентноспособных лекарственных средств – приоритетное направление развития фармацевтической науки», 2015 г, «Посвящается 70-летию победы Великой Отечественной войне», 2016 г; Международной научно-практической конференции: «Scientific research of the sco countries: synergy and integration» (г. Пекин, 2019 г); IV Всероссийской научно-практической конференции (г. Пенза, МЦНС «Наука и просвещение», 30 октября 2019 г); II Международной научно-практической юбилейной конференции «Гармонизация подходов к фармацевтической разработке» (г. Москва, РУДН, 14 ноября 2019 г).

Личный вклад автора. Персональное участие автора заключается в выборе темы научной работы, в выполнении исследований по изучению морфологических, анатомических особенностей строения персика обыкновенного листьев, выявлении их диагностических признаков. Автором проанализирован состав БАВ персика обыкновенного листьев. Разработана и валидирована методика количественного определения суммы флавоноидов персика обыкновенного листьев. Разработан проект фармакопейной статьи (ФС) – «Персика обыкновенного листа», инструкция по сбору и сушке персика обыкновенного листьев. Разработаны и апробированы: технология персика обыкновенного листьев экстракта густого, ТУ «Персика обыкновенного листьев экстракт густой», лабораторный регламент «Производство персика обыкновенного листьев экстракта густого». Автором подготовлены публикации, доклады на конференции, автореферат и диссертационная работа.

Связь темы диссертации с планом основных научно-исследовательских работ. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО ПГФА Минздрава России (номер регистрации темы 01.9.100.18875).

Соответствие паспорту специальности. Диссертационное исследование соответствует паспорту научной специальности 14.04.02 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) по пунктам 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»; 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».

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (глава 1), экспериментальной части (глава 2-5), общих выводов, списка литературы и приложений. Работа изложена на 156 страницах машинописного текста (из них 16 страниц приложения), содержит 42 таблицы, 31 рисунок, 185 библиографических источников, из которых 12 на иностранных языках.

Публикации по теме диссертации. По материалам диссертации опубликовано 8 научных статей, из них 3 статьи в изданиях из перечня, рекомендованного ВАК при Министерстве образования и науки Российской Федерации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

В качестве объектов исследования выступали персика обыкновенного листья и экстракт густой на их основе. Данные обобщены в табл. 1.

Таблица 1 – Объекты исследования

Образец	Место сбора/место изготовления	Время сбора/дата изготовления
Персика обыкновенного листа, образец № 1	Окрестности г. Майкоп, Краснодарский край	08. 2015 г
Персика обыкновенного листа, образец № 2	Окрестности г. Майкоп, Краснодарский край	08. 2016 г
Персика обыкновенного листа, образец № 3	Окрестности г. Геленджик, Краснодарский край	08. 2016 г
Персика обыкновенного листа, образец № 4	Окрестности г. Майкоп, Краснодарский край	08. 2017 г
Персика обыкновенного листа, образец № 5	Окрестности г. Геленджик, Краснодарский край	08. 2017 г
Персика обыкновенного листьев экстракт густой, серия 001	ООО «Апифитофарм», г. Пермь	01.09.2016
Персика обыкновенного листьев экстракт густой, серия 002	ООО «Апифитофарм», г. Пермь	10.10.2017
Персика обыкновенного листьев экстракт густой, серия 003	ООО «Апифитофарм», г. Пермь	10.01.2018
Персика обыкновенного листьев экстракт густой, серия 004	ООО «Апифитофарм», г. Пермь	15.10.2018
Персика обыкновенного листьев экстракт густой, серия 005	ООО «Апифитофарм», г. Пермь	10.01.2019

Определение подлинности сырья проводили с использованием методов макро- и микроскопического анализа по методикам ГФ XIV, ОФС.1.5.3.0004.15, ОФС.1.5.3.0003.15, ОФС. 1.5.1.0001.15, ОФС. 1.5.1.0003.15. Анатомические признаки изучали с помощью микроскопа «Биомед 6», увеличение 640х, 160х. Микрофотографии выполняли цифровой камерой «DCM 510» в программе Score. Проведение исследования микропрепаратов осуществлялось в отраженном и проходящем свете при помощи цифровых микроскопов марки «Motic»: DM-111 и DM-39C – N9GO-A.

Определение влажности проводили по стандартной методике, предложенной в ГФ XIV, ОФС.1.5.3.0007.15 «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Определение золы общей проводилось по стандартной методике, предложенной в ГФ XIV, ОФС.1.2.2.2.0013.15 «Зола общая».

Проект Фармакопейной статьи «Персика листья» разрабатывался в соответствии с ОСТ 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения», ГФ XIV часть 1, «Руководством по стандартизации лекарственных средств».

Количественное определение дубильных веществ в растительном сырье и экстракте густом проводили перманганатометрическим методом согласно методике ГФ XIV, ОФС.1.5.3.0008.18 «Определение содержания дубильных веществ в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Качественное обнаружение каротиноидов проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинках "Силуфол" восходящим способом в системе растворителей: гексан-ацетон (8:2). Качественное обнаружение аскорбиновой кислоты проводили согласно ГФ XIV, ФС.2.1.0058.18 «Аскорбиновая кислота». Количественное определение каротиноидов в сырье и экстракте проводили спектрофотометрическим методом, аскорбиновой кислоты – титриметрически согласно ГФ XIV, ФС.2.5.0106.18, «Шиповника плоды».

Для качественного и количественного определения флавоноидов в персике обыкновенного листьев экстракте густом использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Исследование проводили на жидкостном хроматографе "Милихром А-02" с УФ - детектором. Для количественного определения суммы флавоноидов в персике обыкновенного листьях и экстракте густом, помимо метода ВЭЖХ, использовали спектрофотометрический метод после проведения реакции комплексообразования с хлоридом алюминия.

Изучение элементного состава персика обыкновенного листьев и экстракта густого проводили рентгено-флюоресцентным методом в зольном остатке на энерго-дисперсионном спектрометре Quantix.

Определение биологической активности проводили под руководством кандидата медицинских наук, доцента, заведующей кафедры физиологии ПГФА Рудаковой Ирины Павловны.

Исследование острой токсичности персика обыкновенного листьев экстракта густого проводили с помощью экспресс метода определения средней летальной дозы по методу Прозоровского. Определение противовоспалительной активности персика обыкновенного листьев экстракта густого - на модели острого воспалительного отека, вызванного субплантарным введением в заднюю лапу крысы 0,1 мл 1% водного раствора каррагинена. В качестве препарата сравнения использовали лекарственный препарат «Нимесулид».

Для определения антиоксидантной активности персика обыкновенного листьев экстракта густого использовали реакцию со стабильным свободным радикалом 2,2-

дифенил-1-пикрилгидразилом (ДФПГ). Исследование проводили спектрофотометрическим методом.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Морфолого-анатомическое исследование персика обыкновенного листьев

Морфологические признаки: Сырье представлено простыми листьями, продолговато-ланцетовидной формы, с перистым жилкованием, край листа - пильчатый. С верхней стороны листья зеленые, с нижней стороны – светло-зеленые, голые. Вкус водного извлечения горьковато-вяжущий.

Анатомические признаки: Изучение микро-диагностических признаков проводили на временных микропрепаратах, с последующей микрофотосъемкой.

При рассмотрении препарата листа персика с поверхности видны клетки эпидермиса с прямыми стенками, как с верхней, так и с нижней стороны, кутикула складчатая (рис.1). Устьица расположены преимущественно с нижней стороны листа, окружены двумя околоустьичными клетками, расположенными параллельно устьичной щели (парацитный тип) (рис. 2). По краю листа расположены простые одно - двухклеточные волоски, покрытые толстым слоем кутикулы (рис. 3). С нижней стороны листа по жилкам встречаются простые тонкостенные одноклеточные волоски (рис. 4). В мезофилле содержатся одиночные призматические кристаллы оксалата кальция и многочисленные друзы, расположенные преимущественно по жилкам (рис. 5,6). По строению мезофилла лист дорсовентральный (рис. 7). Главная жилка (рис. 8) включает в себя закрытый коллатеральный пучок. Под эпидермой в районе главной жилки расположена рыхлая колленхима. Ассимиляционная ткань, окружающая главную жилку, содержит большое количество друз оксалата кальция.



Рис. 1. Эпидермис листа со складчатой кутикулой (640x)

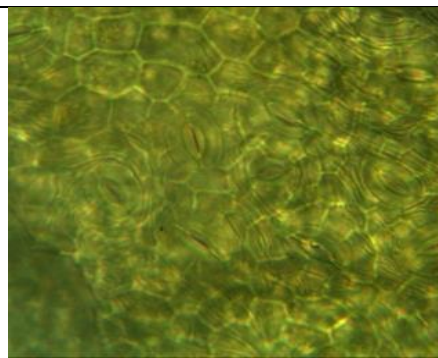


Рис. 2. Парацитный тип устьичного аппарата (640x)

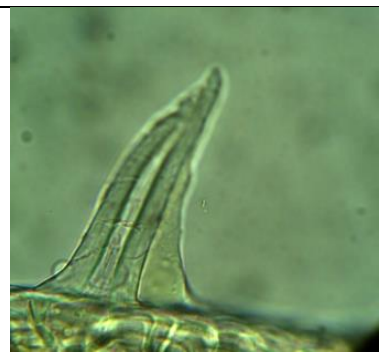


Рис. 3. Простой толстостенный волосок по краю листа (640x)

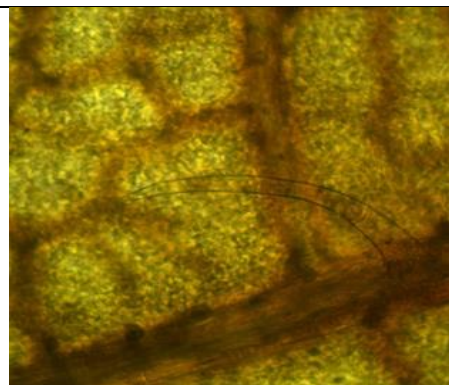


Рис. 4. Тонкостенный волосок по жилке (160x)

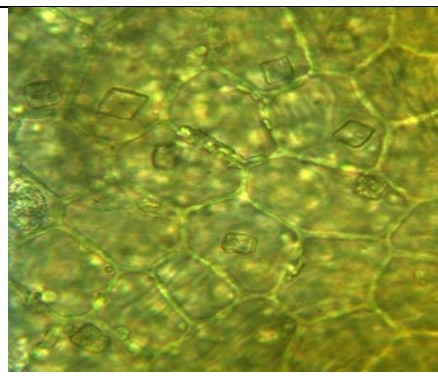


Рис. 5. Кристаллы оксалата кальция (640x)

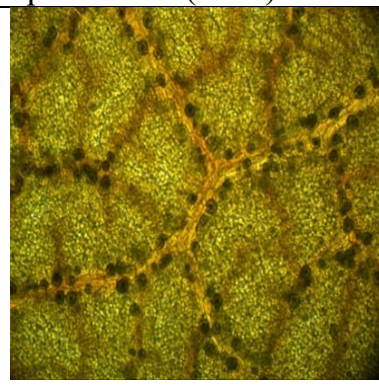


Рис. 6. Друзы оксалата кальция (160x)



Качественное и количественное определение групп биологически активных веществ в персике обыкновенном листьях

Подтверждено наличие в сырье: флавоноидов – качественными реакциями; методом бумажной хроматографии; дубильных веществ, аскорбиновой кислоты - качественными реакциями; каротиноидов – методом тонкослойной хроматографии.

Количественное содержание биологически активных веществ в сырье составило: суммы дубильных веществ, в пересчете на таннин – $1,82\% \pm 0,069$; суммы каротиноидов, в пересчете на β -каротин – $0,087\% \pm 0,006$; аскорбиновой кислоты - $0,018\% \pm 0,002$. Результаты представлены в табл. 2.

Таблица 2 - Содержание БАВ в персике обыкновенном листьях

	Образец № 1	Образец № 2	Образец № 3	Образец № 4	Образец № 5	Среднее значение
Содержание дубильных веществ, в пересчете на таннин	1,82 %	1,78 %	1,82 %	1,75 %	1,90 %	$1,82\% \pm 0,069$
Содержание каротиноидов, в пересчете на β -каротин	0,088 %	0,090 %	0,085 %	0,080 %	0,092 %	$0,087\% \pm 0,006$
Содержание аскорбиновой кислоты	0,018 %	0,020 %	0,017 %	0,021 %	0,017 %	$0,018\% \pm 0,002$

Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в персике обыкновенном листьях

1) Выбор аналитической длины волны

Измерение оптической плотности проводили в интервале длин волн от 350 нм до 430 нм.

Для определения аналитической длины волны были изучены УФ-спектры спиртовых извлечений сырья персика обыкновенного и Государственного стандартного образца (ГСО) рутина

Результаты исследования показали, что собственный спектр спиртового извлечения из персика обыкновенного листьев имеет максимум при длине волны 364 нм (рис. 9). Дифференциальный спектр того же извлечения с алюминия хлоридом имеет максимум при длине волны 409 нм (рис. 10). Максимум в этом интервале характерен для ГСО рутина в присутствии алюминия хлорида, при длине волны 410 нм (рис. 11). Это дает возможность использовать длину волны 410 нм в качестве аналитической.

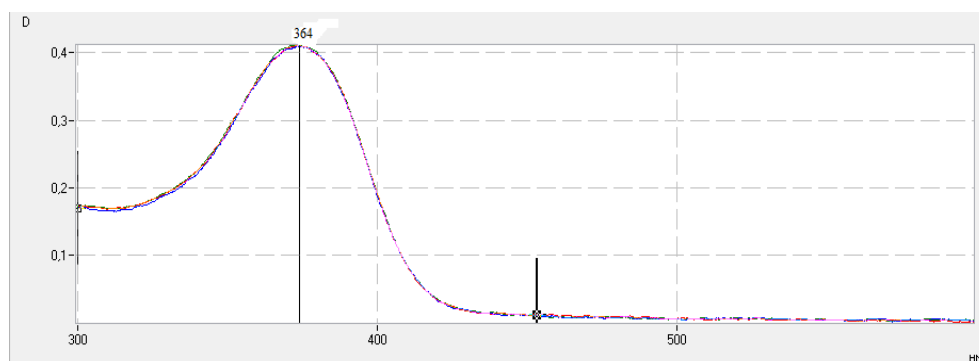


Рис. 9. Собственный спектр спиртового извлечения из персика обыкновенного листьев

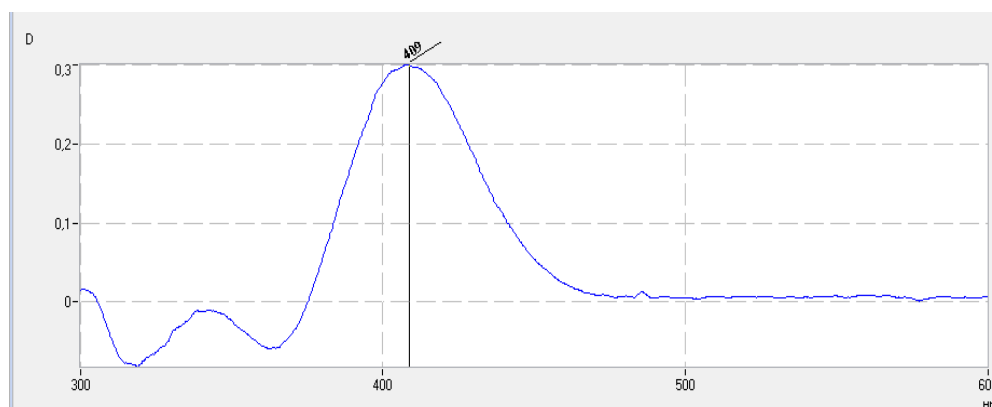


Рис. 10. Дифференциальный спектр поглощения спиртового извлечения из персика обыкновенного листьев с раствором алюминия хлорида

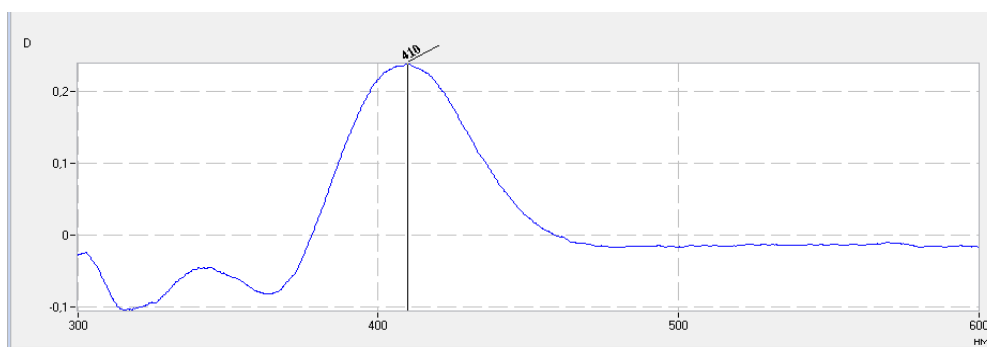


Рис. 11. Дифференциальный спектр поглощения ГСО рутина в присутствии алюминия хлорида

2) Изучение условий реакции комплексообразования

Для определения полноты протекания реакции и устойчивости комплекса флавоноидов с 2% спиртовым раствором алюминия хлорида проведен анализ спиртовых извлечений с различными вариантами соотношений: извлечение – хромогенный реактив.

Варианты исследованных соотношений представлены в табл. 3.

Таблица 3 - Зависимость оптической плотности от соотношения извлечения (раствор А) и алюминия хлорида

№ п/п	Соотношение извлечения и реактива	Оптическая плотность, D	Содержание флавоноидов, %
1.	1:1	0,3001	1,81
2.	1:2	0,2905	1,75
3.	1:3	0,3054	1,84
4.	2:2	0,6393	3,86
5.	2:3	0,3419	2,06
6.	2:4	0,3736	2,25
7.	2:5	0,3982	2,40

Анализ показал, что оптимальным соотношением объема раствора А и 2% раствора алюминия хлорида является соотношение 2:2, при котором наблюдается максимальная плотность и наибольшее содержание суммы флавоноидов.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в персике обыкновенном листьях

На основании полученных результатов нами предложена методика количественного определения суммы флавоноидов, в пересчете на рутин, для персика обыкновенного листьев.

Методика:

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, и добавляют 50 мл 70 % этилового спирта. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 минут, периодически встряхивая для смывания частиц сырья со стенок. Горячее извлечение фильтруют через вату в мерную колбу вместимостью 100 мл так, чтобы частицы сырья не попали на фильтр. Вату помещают в колбу для экстрагирования, и прибавляют еще 50 мл 70 % этилового спирта. Проводят повторную экстрак-

цию. Горячее извлечение фильтруют в ту же мерную колбу через бумажный фильтр. После охлаждения фильтр промывают 70% этиловым спиртом, доводят объем извлечения до метки, и перемешивают (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2 мл раствора А, прибавляют 2 мл 2% раствора алюминия хлорида в 95% этиловом спирте, 1 каплю разведенной уксусной кислоты и доводят объем раствора до метки 95% этиловым спиртом. Через 10 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 410 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют следующий раствор: 2 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 1 каплю разведенной уксусной кислоты и доводят объем раствора 95% этиловым спиртом до метки.

Содержание суммы флавоноидов, в пересчете на рутин – стандарт, на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле (1):

$$\frac{A \cdot m_0 \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot m \cdot 100 \cdot (100 - W) \cdot 2}, \text{ где (1)}$$

A – оптическая плотность исследуемого раствора; m_0 – масса ГСО рутин в граммах; A_0 – оптическая плотность раствора ГСО рутин; m – масса сырья в граммах; W – потеря в массе при высушивании сырья в %.

Содержание флавоноидов, в пересчете на рутин, в персике обыкновенном листьях составило $1,78\% \pm 0,075$. Результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4 - Содержание флавоноидов, в пересчете на рутин, в персике обыкновенном листьях

Образец	Содержание флавоноидов, в пересчете на рутин
№ 1	1,78 %
№ 2	1,82 %
№ 3	1,69 %
№ 4	1,85 %
№ 5	1,77 %
Среднее значение	$1,78\% \pm 0,075$

При валидации методики количественного определения флавоноидов в персике обыкновенном листьях установлено, что она не отягощена систематической ошибкой, результаты анализа являются правильными, точными и воспроизводимыми.

Определение оптимальных параметров экстракции суммы флавоноидов из персика обыкновенного листьев

При производстве фитопрепаратов основной технологической стадией является экстрагирование растительного сырья. Анализ методов экстракции, используемых для извлечения флавоноидов из лекарственного растительного сырья, показал, что наибольший выход флавоноидов достигается методом мацерации при нагревании, и периодическом перемешивании.

При детальном рассмотрении факторов, влияющих на процесс выделения действующих веществ из лекарственного сырья, проведен подбор оптимальных режимов экстрагирования суммы флавоноидов из персика обыкновенного листьев: экстрагент, температура экстракции, продолжительность экстракции, степень измельчения сырья, гидромодуль. Результаты опытов с использованием различных экстрагентов приведены на рис. 12.

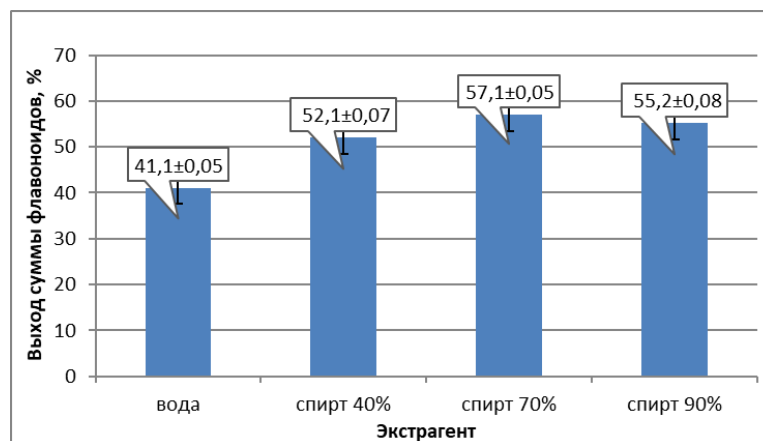


Рис. 12. Выход суммы флавоноидов в зависимости от состава экстрагента

На основании анализа полученных данных выявлено, что наилучшим экстрагентом является спирт этиловый раствор 70%.

Для определения температурного режима изучено влияние нагревания на выход суммы флавоноидов. Результаты анализа приведены на рис. 13.

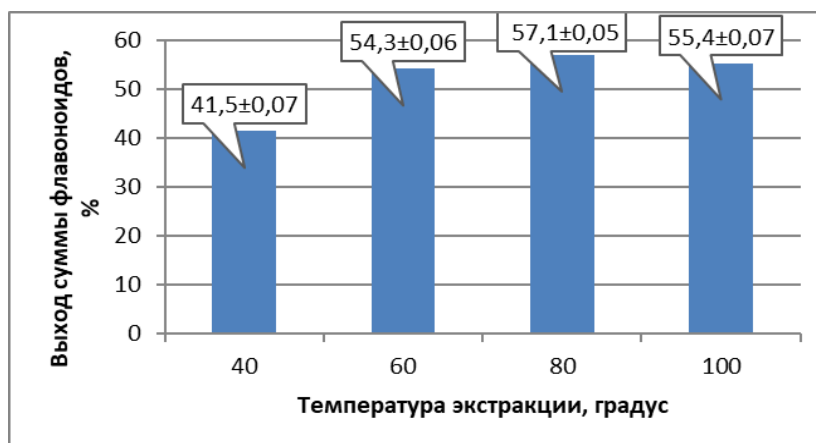


Рис. 13. Выход суммы флавоноидов в зависимости от температуры экстракции.

При этом установлено, что наибольший выход флавоноидов достигается экстракцией при температуре 80°C.

Для определения продолжительности экстракции изучено влияние времени на выход суммы флавоноидов. Результаты анализа приведены на рис. 14.

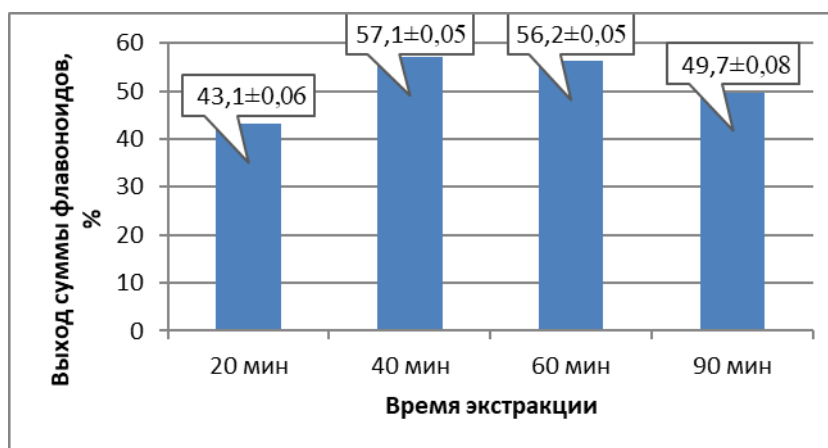


Рис. 14. Выход суммы флавоноидов в зависимости от продолжительности экстракции.

Установлено, что наибольший выход флавоноидов достигается при экстракции в течение 40 минут.

Для исследования влияния степени измельчения сырья на выход суммы флавоноидов, сырье просеивали через сита с отверстиями диаметром от 1-5 мм. Полученные результаты представлены на рис. 15.

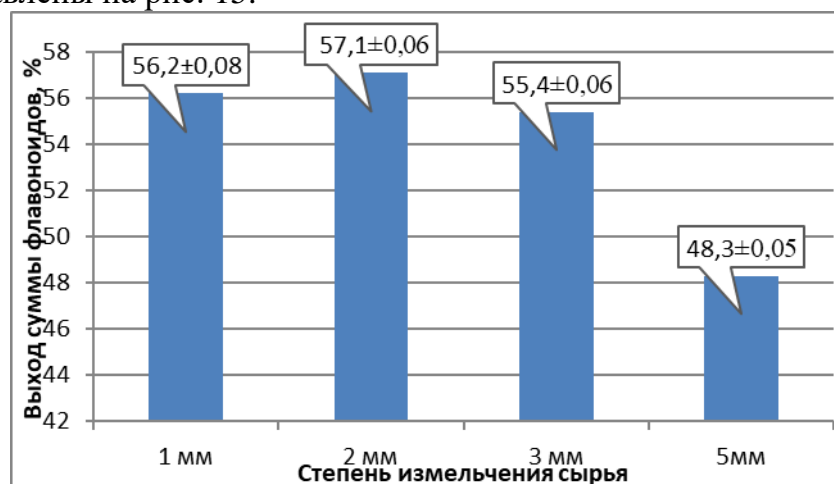


Рис. 15. Выход суммы флавоноидов в зависимости от степени измельчения сырья

При этом установлено, что наибольший выход суммы флавоноидов наблюдается при экстрагировании сырья со степенью измельчения 2 мм.

При изучении влияния гидромодуля экстракции на выход флавоноидов из персика обыкновенного листьев, готовили извлечения из сырья с размером частиц 2 мм в соотношении 1:7, 1:10, 1:15, 1:20. Время экстракции составляло 40 мин, в качестве экстрагента использовали спирт этиловый раствор 70%, обеспечивающий максимальный выход флавоноидов из персика обыкновенного листьев.

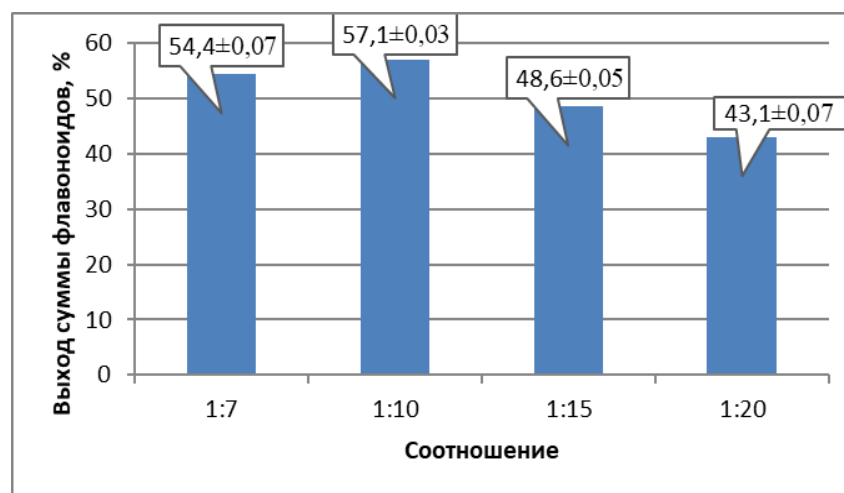


Рис. 16. Зависимость выхода суммы флавоноидов из листьев персика обыкновенного от соотношения сырье – экстрагент

На основании анализа данных, представленных на рис. 16, установлено, что наибольший выход суммы флавоноидов наблюдается при соотношении сырье – экстрагент 1:10.

Таким образом, установлены факторы, обеспечивающие максимальный выход суммы флавоноидов из персика обыкновенного листьев: мацерация при температуре 80⁰С в течение 40 мин, экстрагент – спирт этиловый раствор 70%, степень измельчения сырья – 2 мм, соотношение сырье-экстрагент – 1:10 (стадия ТП 3 – получение вытяжки). По разработанной технологии получены пять серий экстракта густого (001,002, 003, 004, 005).

Для стандартизации полученных серий персика обыкновенного листьев экстракта густого использованы методики качественного и количественного анализа разработанные для стандартизации сырья персика обыкновенного, адаптированные к экстракту; количественное содержание суммы флавоноидов, в пересчете на рутин, в экстракте густом определяли спектрофотометрическим методом; количественное содержание рутина - методом ВЭЖХ; количественное содержание дубильных веществ - перманганатометрическим методом; количественное содержание каротиноидов - спектрофотометрическим методом; количественное содержание аскорбиновой кислоты - йодометрическим методом. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5- Содержание БАВ в персике обыкновенном листьях экстракте густом

	Образец № 1	Образец № 2	Образец № 3	Образец № 4	Образец № 5	Среднее значение
1	2	3	4	5	6	7
Содержание суммы флавоноидов, в пересчете на рутин	5,09 %	5,10 %	4,88 %	5,07 %	5,31 %	5,1 % ± 0,19
Содержание дубильных веществ, в пересчете на танин	5,89 %	6,09 %	6,29 %	6,01 %	6,09 %	6,07 % ± 0,18

1	2	3	4	5	6	7
Содержание каротиноидов, в пересчете на β -каротин	0,72 %	0,75 %	0,73 %	0,74 %	0,71 %	0,73% \pm 0,02
Содержание аскорбиновой кислоты	1,09 %	0,97 %	0,99 %	1,30 %	1,13 %	1,1 % \pm 0,16

Анализируя полученные результаты, можно отметить, что в персике обыкновенном листьях экстракте густом содержание флавоноидов, в пересчете на рутин составило 5,1 % \pm 0,19; дубильных веществ, в пересчете на танин - 6,07 % \pm 0,18; каротиноидов, в пересчете на β -каротин - 0,73% \pm 0,02; аскорбиновой кислоты - 1,1 % \pm 0,16.

Идентификацию рутина в персике обыкновенном листьях экстракте густом проводили методом ВЭЖХ. Количественное содержание рутина представлено в табл. 6.

Таблица 6 - Содержание рутина в персике обыкновенном листьях экстракте густом

№	Навески	Площади хроматографического пика рутина в испытуемом растворе и растворе ГСО рутина	Содержание рутина в персике обыкновенном листьях экстракте густом, (%)
1	$a_1 = 0,25085$	$S_1 = 15,52$	$X_1 = 0,81$
	$a_2 = 0,24840$	$S_2 = 15,91$	$X_2 = 0,84$
	$a_3 = 0,24795$	$S_3 = 14,93$	$X_3 = 0,79$
	$a_0 = 0,00415$	$S_0 = 15,82$	$X_{cp.} = 0,81 \pm 0,06$
2	$a_1 = 0,28665$	$S_1 = 17,04$	$X_1 = 0,76$
	$a_2 = 0,26340$	$S_2 = 16,89$	$X_2 = 0,82$
	$a_3 = 0,25550$	$S_3 = 15,99$	$X_3 = 0,80$
	$a_0 = 0,00480$	$S_0 = 18,77$	$X_{cp.} = 0,79 \pm 0,076$
3	$a_1 = 0,26140$	$S_1 = 15,67$	$X_1 = 0,77$
	$a_2 = 0,27265$	$S_2 = 16,21$	$X_2 = 0,76$
	$a_3 = 0,23805$	$S_3 = 15,08$	$X_3 = 0,81$
	$a_0 = 0,00525$	$S_0 = 20,43$	$X_{cp.} = 0,78 \pm 0,066$

Анализируя полученные результаты, можно отметить, что содержание рутина в персике обыкновенном листьях экстракте густом, составило 0,79 % \pm 0,04.

Исследование элементного состава персика обыкновенного листьев экстракта густого

Наибольшее содержание, среди элементов в персике обыкновенном листьях приходится на калий и кальций. В персике обыкновенном листьев экстракте густом наибольшее содержание, среди элементов приходится на калий и натрий (табл. 7). Тяжелые металлы в персике обыкновенном листьях содержатся в количествах, не превышающих значения ПДК, установленных ОФС.1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах», Техническим регламентом Таможенного Союза 021/2011 «О безопасности пищевой продукции». Тяжелые металлы в экстракте густом не обнаружены. Ряд биологического поглощения элементов в сырье выглядит следующим образом: К>Са>Na>P>Mg>S>Al>Fe>Mn>Si>Ti>Zn>Cu>Ba>Ni>Mo>Sn>Pb

Ряд элементного состава экстракта густого: К>Na>Ca>P>Al>Fe>Mg>S>Mn>Zn>Ti>Cu>Ni>Cr.

Таблица 7 – Содержание макро- и микроэлементов в персике обыкновенном листьях и экстракте густом

Элемент	Содержание в сырье, мкг/кг	Содержание в экстракте, мкг/кг
Cu	249,0	533,0
Zn	371,0	824,0
Na	34000,0	52000,0
Mg	10590,0	5310,0
Al	7780,0	8120,0
Si	1548,0	Не обнаружено
P	15090,0	14800,0
S	7843,0	3312,0
K	578000,0	878000,0
Ca	335000,0	28780,0
Ti	759,0	654,0
Mn	2240,0	827,0
Fe	5899,0	697,7
Ni	37,0	84,0
Pb	12,0	Не обнаружено
Mo	29,0	Не обнаружено
Sn	27,0	Не обнаружено
Ba	120,0	Не обнаружено

Подтверждение срока годности проводили от 6 месяцев до 2,5 лет. Срок хранения персика обыкновенного листьев экстракта густого составил 2 года и 6 месяцев. Таким образом, установлен срок годности экстракта густого – 2 года.

На основании данных, полученных в результате качественного и количественного анализа персика обыкновенного листьев экстракта густого, обоснованы показатели качества, обобщенные в виде спецификации, представленной в табл.8.

Таблица 8 - Спецификация показателей качества персика обыкновенного листьев экстракта густого

Наименование показателя	Требование НД	Характеристика экстракта густого
Описание	Вязкая масса темно-коричневого цвета горьковатого вкуса со специфическим запахом	Вязкая масса темно-коричневого цвета горьковатого вкуса со специфическим запахом
Подлинность	Флавоноиды определяли с помощью качественных реакций	Качественные реакции положительны
Содержание флавоноидов, %	Не менее 5,0 %	5,1 %
Массовая доля влаги, %	Не более 20,0 %	19,0 %± 0,12
Тяжелые металлы, %	Не более 0,01%	Не обнаружено
Упаковка	Банки из стекломассы с винтовой горловиной оранжевого стекла	Банки из стекломассы с винтовой горловиной оранжевого стекла
Хранение	В сухом прохладном защищенном от света месте	В сухом прохладном защищенном от света месте
Срок годности	24 месяца	24 месяца

Содержание биологически активных веществ в персике обыкновенном листьях и экстракте густом из них

Сравнительное содержание БАВ в сырье и экстракте густом представлено в табл. 9.

Таблица 9 – Содержание БАВ в персике обыкновенном листьях и экстракте густом из них

Наименование БАВ	Содержание в лекарственном растительном сырье (среднее значение)	Содержание в экстракте густом (среднее значение)	% перехода БАВ из сырья в экстракт
Флавоноиды, в пересчете на рутин	1,78 %	5,1 %	89,5 %
Дубильные вещества в пересчете на танины	1,82 %	6,07 %	95,0 %
Каротиноиды	0,087 %	0,73 %	97,0 %
Аскорбиновая кислота	0,018 %	1,10 %	98,0 %

Полученный экстракт густой содержит большое количество биологически активных веществ. Из персика обыкновенного листьев в экстракт густой перешло от 89,5% до 98,0 %.

Исследование фармакологической активности персика обыкновенного листьев экстракта густого

Результаты исследования острой токсичности позволяют отнести персика обыкновенного листьев экстракт густой к классу 4 малотоксичных веществ ($LD_{50} > 5000$).

Персика обыкновенного листьев экстракт густой проявляет противовоспалительную активность примерно равную лекарственному препарату «Нимесулид», одному из часто назначаемых препаратов группы НПВС, и умеренную антиоксидантную активность, соизмеримую с антиоксидантной активностью настоя плодов шиповника.

ВЫВОДЫ

1. Установлены диагностические морфолого-анатомические признаки персика обыкновенного листьев, положенные в основу проекта ФС «Персика обыкновенного листа».

2. Определены товароведческие показатели персика обыкновенного листьев, включенные в раздел «Испытания» проекта ФС «Персика обыкновенного листа»: влажность – не более 8,0 %; зола общая - не более 7,5 %; зола не растворимая в растворе хлористоводородной кислоты - не более 5,0 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм (цельное сырье) - не более 5,0 %; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7мм (измельченное сырье) - не более 5,0 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм (измельченное сырье) - не более 5,0 %; частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями 0,18 мм (порошок) - не более 5,0 %.

3. Установлено наличие основных групп БАВ: флавоноидов, дубильных веществ, аскорбиновой кислоты, каротиноидов. Разработана методика количественного определения флавоноидов в персике обыкновенном листьях на основе фармакопейной методики определения флавоноидов в зверобоя траве, адаптированная для исследуемого сырья. Определено количественное содержание: флавоноидов в персике обыкновенном листьях, которое составило $1,78\% \pm 0,075$, дубильных веществ $-1,82\% \pm 0,069$, аскорбиновой кислоты $-0,018\% \pm 0,002$, каротиноидов $-0,087\% \pm 0,006$.

4. Изучено содержание элементного состава, персика обыкновенного листьев и экстракта густого из них. Наибольшее содержание, среди элементов в персике обыкновенном листьях приходится на калий и кальций. В персике обыкновенном листьев экстракте густом наибольшее содержание, среди элементов приходится на калий и натрий. Тяжелые металлы в персике обыкновенном листьях содержатся в количествах, не превышающих значения ПДК, установленных ОФС.1.5.3.0009.15 «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах», Техническим регламентом Таможенного Союза 021/2011 «О безопасности пищевой продукции». Тяжелые металлы в экстракте густом не обнаружены. Определен ряд биологического поглощения микроэлементов в персике обыкновенном листьях: $K > Ca > Na > P > Mg > S > Al > Fe > Mn > Si > Ti > Zn > Cu > Ba > Ni > Mo > Sn > Pb$; в экстракте густом - $K > Na > Ca > P > Al > Fe > Mg > S > Mn > Zn > Ti > Cu > Ni > Cr$.

5. Проведена валидационная оценка методики количественного определения флавоноидов, экспериментально оценены линейность, правильность, межлабораторная повторяемость, прецизионность. Определена относительная ошибка единичного определения с вероятностью 95%, которая составила $\pm 3,13\%$.

6. Определены оптимальные параметры экстракции суммы флавоноидов персика обыкновенного листьев для получения экстракта густого: экстрагент- спирт этиловый раствор 70%; экстракция при температуре 80°C ; в течение 40 минут; степень измельчения сырья – 2 мм; соотношение сырье-экстрагент – 1:10. Разработана технология персика обыкновенного листьев экстракта густого, с учетом физико-химических свойств комплекса БАВ сырья, с целью получения субстанции с максимальным содержанием БАВ.

7. Проведена стандартизация персика обыкновенного листьев экстракта густого, определены показатели качества: содержание суммы флавоноидов, в пересчете на рутин - не менее 5 %, массовая доля влаги – не более 20,0 %, тяжелые металлы – не более 0,01 %. Установлен срок годности персика обыкновенного листьев экстракта густого при хранении, при температуре $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$, не менее 2 лет.

8. Разработаны, утверждены, и апробированы нормативные документы предприятия ООО «Апифитофарм»: технические условия «Персика обыкновенного листьев экстракт густой», лабораторный регламент «Производство персика обыкновенного листьев экстракта густого».

9. На основании проведенных исследований острой токсичности персика обыкновенного листьев экстракта густого установлено, что экстракт относится к классу «малотоксичных веществ» $\text{LD}_{50} > 5000$ мг/кг. Определена умеренная антиоксидантная активность персика обыкновенного листьев экстракта густого, спектрофотометрическим методом, по реакции со стабильным свободным радикалом ДФПГ, сопоставимая с плодов шиповника настоем. Выявлена противовоспалительная активность персика обыкновенного листьев экстракта густого на модели острого воспалительного отека, равная активности лекарственного препарата «Нимесулид».

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам проведённых исследований разработан проект ФС «Персика обыкновенного листа», а так же, обосновано использование в медицинской практике персика обыкновенного листа экстракта густого для создания лекарственных средств, обладающих противовоспалительным, антиоксидантным действием.

Рекомендации. Разработанный проект ФС «Персика обыкновенного листа» может быть использован при производстве лекарственных препаратов и оценке их качества фармацевтическими предприятиями. Исследования химического состава и биологической активности персика обыкновенного листа могут быть внедрены в учебный процесс и научно-исследовательскую работу ВУЗов.

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в разработке новых лекарственных средств на основе персика обыкновенного листа и персика обыкновенного листа экстракта густого.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Иванцова, Л.В. К исследованию антиоксидантной активности листьев Персика обыкновенного — *Persika vulgaris folia* / Л.В. Иванцова, В.Д. Белоногова, Д.К. Гуляев // **Традиционная медицина**. - 2019. - № 3 (58). - С. 10-13.
2. Иванцова, Л.В. Фармакогностическое исследование персика обыкновенного листьев / Л.В. Иванцова, О.Л. Блинова, А.А. Гилева, В.Д. Белоногова // **Медицинский вестник Башкортостана**. - 2017. - Том 12, № 6 (72). - С. 108-111.
3. Кулбаева, Т.В. Микроскопический анализ листьев персика обыкновенного / Т.В. Кулбаева, Л.В. Иванцова, А.А. Гилева // **Вестник ПГФА**. -2016. - № 17 - С. 183
4. Ivantsova, L.V. The study of the elemental composition of leaves, a dense extract of common peach - *Persica vulgaris* Mill / L.V. Ivantsova, V.D. Belonogova, D.K. Gulyaev // **Scientific research of the sco countries: synergy and integration**, г. Пекин, 2019. – С. 84-88.
5. Иванцова, Л.В. Определение флавоноидов в листьях персика обыкновенного: валидация методики / Л.В. Иванцова, В.Д. Белоногова, А.А. Гилева // **Фармация**. – 2018. - Том 67, № 7. - С. 27-31.
6. Иванцова, Л.В. Разработка технологии экстракционного препарата из листьев персика обыкновенного (*Persika vulgaris* Mill.). Гармонизация подходов к фармацевтической разработке / Л.В. Иванцова, Е.И. Молохова // **Сборник тезисов II Международной научно-практической конференции**. Москва, ноябрь 2019 г. – Москва: РУДН, 2019.- С. 196-197.
7. Иванцова, Л.В. Исследование противовоспалительной активности биологически активной добавки к пище «Оксифрин» / Л.В. Иванцова, А.И. Забоева., Г.Ф. Хафизова // **Вестник ПГФА**. - 2015. - № 15 - С. 89
8. Иванцова, Л.В. Изучение острой токсичности и противовоспалительной активности экстракционного препарата из листьев персика обыкновенного / Л.В. Иванцова, Е.И. Молохова, И.П. Рудакова, Е.В. Зверева // **Сборник статей IV Всероссийской научно-практической конференции**. Пенза, октябрь 2019 г. – С.199-201.

Иванцова Любовь Витальевна (Россия)

Фармакогностическое исследование, стандартизация персика обыкновенного листьев и разработка экстракта густого на его основе

Установлены диагностические морфолого-анатомические признаки персика обыкновенного листьев. Определены товароведческие показатели персика обыкновенного листьев. Установлено наличие основных групп БАВ: флавоноидов, дубильных веществ, аскорбиновой кислоты, каротиноидов. Разработана методика количественного определения флавоноидов в персике обыкновенном листьях. Разработана технология персика обыкновенного листьев экстракта густого, с учетом физико-химических свойств комплекса БАВ сырья, с целью получения субстанции с максимальным содержанием комплекса БАВ. Разработаны нормативные документы предприятия ООО «Апифитофарм»: Технические Условия «Персика обыкновенного листьев экстракт густой», лабораторный регламент «Производство персика обыкновенного листьев экстракта густого». Исследована острая токсичность, противовоспалительная, антиоксидантная активность персика обыкновенного листьев экстракта густого.

Ivantsova Liubov Vitalievna (Russia)

Pharmacognostic research, standardization of common peach leaves and development of a thick extract based on it

Diagnostic morphological and anatomical features of the common leaf peach were established. Commodity indicators of ordinary peach are determined. The presence of the main groups of BAS was established: flavonoids, tannins, ascorbic acid, and carotenoids. A method of quantitative determination of flavonoids in common peach leaves has been developed. The technology of peach ordinary leaf extract thick, taking into account the physical and chemical properties of complex BAS raw materials, in order to obtain a substance with the maximum content of complex BAS. Developed regulatory documents of the company "Apifitopharm": Technical Conditions "Peach ordinary leaf extract thick", laboratory regulations "Production of peach ordinary leaf extract thick". The acute toxicity, antiinflammatory, and antioxidant activity of common peach leaf extract was investigated.