

*На правах рукописи*

**ЖИЛКИНА ВЕРА ЮРЬЕВНА**

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ВИТАМИННЫХ СБОРОВ  
ИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ**

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Пермь – 2019

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов»

**Научный руководитель:**

доктор фармацевтических наук, доцент **Марахова Анна Игоревна**

**Научный консультант:**

доктор химических наук, доцент **Станишевский Ярослав Михайлович**

**Официальные оппоненты:**

**Ханина Миниса Абдуллаевна** – доктор фармацевтических наук, профессор, государственное образовательное учреждение высшего образования Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет», кафедра химии, заведующий кафедрой;

**Белоусов Михаил Валерьевич** – доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтического анализа, заведующий кафедрой.

**Ведущая организация:**

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

Защита диссертации состоится «28» мая 2019 г. в 12:00 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 (614990, г. Пермь, ул. Полевая, д. 2, тел./факс (342) 233-55-01).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (614070, г. Пермь, ул. Крупской, д. 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 «\_\_» \_\_\_\_\_ 2019 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 208.068.02  
кандидат химических наук

Замараева Татьяна Михайловна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Доля выпускаемых лекарственных препаратов растительного происхождения ежегодно увеличивается. По данным компании BBS Research, в ближайшие годы ожидается рост мирового рынка лекарственных препаратов растительного происхождения на 6,6 % ежегодно (Рукавицына Н.П., 2017). Эта тенденция объясняется тем, что растительные средства отличаются комплексным воздействием на организм, а также меньшим количеством побочных эффектов по сравнению с синтетическими аналогами.

В связи с учащением простудных и вирусных заболеваний, ухудшении экологии, важную роль в рационе человека играют витамины, которые могут использоваться как в комплексной терапии, так и для профилактики различных заболеваний. Несмотря на то, что в настоящее время практически все витамины получают синтетическим путем, витаминосодержащие лекарственные растения не утратили своей актуальности. В растительном сырье витамины находятся в комплексе с полисахаридами, сапонинами, флавоноидами, вследствие чего проявляют большую биодоступность. Кроме того, природные витамины реже вызывают аллергические реакции и симптомы передозировки.

В Государственный реестр включены витаминные сборы из лекарственного растительного сырья, среди которых особого внимания заслуживают витаминный сбор №1 и витаминный сбор №2. Составляющие компоненты витаминных сборов – плоды смородины черной, плоды рябины обыкновенной и плоды шиповника – богаты такими витаминами как аскорбиновая кислота, витамины К, В<sub>2</sub>, Р, каротиноиды, флавоноиды и органические кислоты.

Нормативная документация на витаминные сборы устарела и не соответствует современным подходам к составлению фармакопейных стандартов качества на лекарственные средства растительного происхождения.

В то же время Стратегия медицинского обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 г. обозначает в качестве одного из главных приоритетов государственной политики разработку конкурентоспособных импортозамещающих отечественных ЛС, в том числе, растительного происхождения. Решить данную задачу можно лишь обеспечив надлежащие требования к стандартизации лекарственного растительного сырья.

В связи с вышесказанным, актуальным является углубленное изучение биологически активных веществ витаминных сборов и их компонентов, а также водных и водно-спиртовых извлечений, с целью усовершенствования нормативной документации (НД).

**Степень разработанности темы исследования.** Анализ литературы показал, что изучением отдельных компонентов сборов витаминных (плодов шиповника, рябины обыкновенной и смородины черной) занимались разные специалисты в области фармакогнозии. Исследованием химического состава и вопросами совершенствования методик количественного определения биологически активных веществ (БАВ) плодов рябины обыкновенной занимались: Е.В. Сергунова, Л.А. Остроумов, Н.В. Исайкина, и плодов черной смородины – В.А. Куркин, Д.С. Круглов, И.П. Анисимович, плодов шиповника – Е.В. Сергунова, А.И. Сливкин. Однако работ, посвященных систематическому анализу витаминных сборов, их компонентов, а также водных и водно-спиртовых извлечений, с целью совершенствования НД, не достаточно. В ГФ XI изд. были включены фармакопейные статьи на плоды шиповника и рябины обыкновенной, однако уровень требований к контролю качества не соответствует тенденции развития современного института фармакопеи. На плоды черной смородины НД отсутствует. Весьма мало научных исследований посвящено изучению возможности создания новых лекарственных форм (ЛФ) на основе компонентов, входящих в состав витаминных сборов.

**Цели и задачи исследования.** Целью настоящего исследования является фармакогностическое изучение витаминных сборов №1, №2 и отдельных компонентов для совершенствования и разработки нормативной документации.

**Задачи, решаемые для достижения поставленной цели:**

1. Провести информационно-аналитические исследования по химическому составу компонентов витаминных сборов №1 и №2 и методов их качественного и количественного анализа.
2. Провести углубленное морфолого-анатомическое изучение сборов и индивидуальных компонентов.
3. Провести качественный анализ БАВ гидрофильной фракции витаминных сборов и их компонентов.

4. Установить количественное содержание суммы органических кислот, кислоты аскорбиновой и дубильных веществ в витаминных сборах и компонентах различными физико-химическими методами.
5. Разработать методики и определить содержание антоцианов, флавоноидов и каротиноидов в витаминных сборах и компонентах.
6. Изучить качественный состав и установить количественное содержание БАВ водных (настои) и водно-спиртовых (настойки) извлечений витаминных сборов и их компонентов. Провести анализ извлечений на наличие антимикробной и антимикотической активности.
7. Предложить проекты НД на витаминные сборы №1 и №2 и плоды смородины черной для включения в Государственную Фармакопею РФ.

**Научная новизна исследования.** Впервые проведено комплексное фармакогностическое исследование витаминных сборов №1 и №2, их отдельных компонентов. Показана применимость принципов «сквозной стандартизации» в цепочке «ЛРС – сбор – настой – настойка».

Разработаны методики определения флавоноидов в витаминных сборах и изучены условия реакции комплексообразования. Проведена валидация разработанных методик.

Предложена методика спектральной идентификации для доказательства подлинности плодов шиповника и витаминного сбора №1 по присутствию трех максимумов поглощения (патент № 2662059 от 28.12.2017).

Усовершенствованы методики количественного анализа каротиноидов, антоцианов и органических кислот в витаминных сборах №1 и №2 и их компонентах.

Уточнены морфолого-анатомические характеристики сборов и компонентов и впервые доказана перспектива применения лазерного сканирующего микроскопа.

Предложена новая лекарственная форма для изучаемых объектов – настойка. Установлены качественные и количественные характеристики компонентов гидрофильной фракции настоек. Доказана антимикробная и антимикотическая активность настоек (патент № 2674334 от 28.12.2017 и патент № 2677331 от 28.12.2017).

**Теоретическая значимость исследования** заключается в разработке подходов к применению принципов «сквозной стандартизации» для анализа сборов из

лекарственного растительного сырья и препаратов на их основе; доказательстве возможности применения титриметрических методов в анализе сборов витаминных и ЛФ на их основе; выявлении влияния рН на селективность протекания реакции комплексообразования флавоноидов с алюминия хлоридом; в обосновании возможности применения лазерного сканирующего микроскопа для изучения морфологии плодов с поверхности.

**Практическая значимость исследования** заключается в совершенствовании методик контроля качества сборов для нормативной документации на витаминные сборы №1 и №2 и разработке проекта фармакопейной статьи (ФС) «Смородины черной плоды». В проектах ФС автором предложена стандартизация витаминных сборов №1 и №2 по показателю «сумма органических кислот» методом потенциометрического титрования и уточнены характеристики подлинности по показателям «Внешние признаки» и «Микроскопия».

Разработанные методики внедрены в работу ООО Фирма «Здоровье» (акт внедрения от 23 мая 2018). Изучена возможность выпуска витаминных сборов в форме настоек и доказана их антимикробная и антимикотическая активности. Предложены методики для подтверждения подлинности и количественного анализа настоек по основным группам БАВ.

**Методология и методы исследования.** Примерами исследований по изучению сборов, которые составили теоретическую основу диссертации, являются труды отечественных специалистов в области фармакогнозии – И.А. Самылиной, А.А. Сорокиной, В.А. Куркина, Н.В. Бобковой, В.Н. Бубенчиковой, Т.Д. Рендюк, и зарубежных ученых (Bieza K., Lois R., Kumamoto M., Rocha L., Nakanishi T., Sofija M. Djordjevic), чьи исследования были посвящены совершенствованию методов стандартизации ЛРС, сборов и лекарственных препаратов (ЛП) на их основе.

При выполнении работы были применены методы сравнительного, документированного анализа, комплекс физико-химических методов, микробиологических испытаний, методы математического анализа и обработки результатов.

**Положения, выносимые на защиту:**

1. Результаты углубленного изучения внешних признаков и микроскопического анализа витаминных сборов №1 и №2 и их компонентов.

2. Результаты разработки и совершенствования методик качественного и количественного анализа БАВ витаминных сборов №1 и №2 и их компонентов.
3. Результаты качественного и количественного анализа БАВ в настоях (водные извлечения) витаминных сборов №1 и №2 и установление их антимикробной и антимикотической активности.
4. Результаты качественного и количественного анализа БАВ настоек из витаминных сборов №1 и №2 и установление их антимикробной и антимикотической активности.
5. Результаты совершенствования нормативной документации на витаминные сборы №1 и №2 и разработки проекта ФС «Смородины черной плоды».

**Степень достоверности результатов.** Достоверность полученных во время исследования результатов подтверждена воспроизводимостью результатов при многократной повторности экспериментов, сопоставлением полученных результатов с литературными данными и их статистической обработкой. Доказана валидность предложенных методик количественного анализа. Научные положения и выводы диссертации базируются на достаточном количестве анализов.

**Апробация результатов исследования.** Основные материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на российских и международных научных конференциях: Научно-практической конференции к 70-летию Ботанического сада Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова «Лекарственные растения Ботанического сада», Москва, 2016 г.; IV Международной научно-практической конференции «Научно – технический прогресс: актуальные и перспективные направления будущего», Кемерово, 2016 г.; Научно-практической конференции «Международная интеграция в сфере химической и фармацевтической промышленности», Москва, 2016 г.; V научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине», Москва, 2017 г.; XXIV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство», Москва, 2017 г.; Международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные исследования в медицине», Сочи, 2017 г.

Апробация диссертации прошла на совместной Научной конференции Института биохимической технологии и нанотехнологии РУДН и кафедры

фармацевтического естествознания Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова.

**Внедрение результатов исследования.** Разработаны и поданы в ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ России проекты НД для включения в Государственную фармакопею РФ: проект ФС «Витаминный сбор №1»; проект ФС «Витаминный сбор №2» и проект ФС «Смородины черной плоды», которые включают в себя новые методики установления подлинности и содержание действующих групп БАВ.

Результаты диссертационного исследования используются в учебных процессах кафедры Биотехнологии и промышленной фармации ФГБОУ ВО «МИРЭА - Российский технологический университет» (акт внедрения от 22.02.2018), Института биохимической технологии и нанотехнологии РУДН (акт внедрения от 29.05.2018), а также кафедры фармации факультета непрерывного образования филиала частного учреждения образовательной организации высшего образования «Медицинский университет «Реавиз» (акт внедрения от 08.12.2017). Разработанные методики внедрены в работу ООО Фирма «Здоровье» (акт внедрения от 23 мая 2018). Также результаты исследования вошли в монографию «Физико-химические методы в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на растительной основе» А.И. Мараховой, А.А. Сорокиной, В.Ю. Жилкиной.

**Личный вклад автора.** Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, анализе и обобщении полученных результатов. В работах, выполненных в соавторстве, диссертант непосредственно участвовал в планировании, выполнении эксперимента и в обработке данных. Лично автором выполнены экспериментально-аналитические исследования по разработке методик качественного и количественного анализа, осуществлена статистическая обработка и валидация, проведено обобщение полученных результатов. Вклад автора является определяющим и заключается в непосредственном участии и выполнении всех этапов исследования: от постановки задач и их реализации до обсуждения результатов в научных публикациях и их внедрения в практику.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия». Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 2, 3, 4, 6

паспорта научной специальности 14.04.02 – «Фармацевтическая химия, фармакогнозия».

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 15 печатных работ, из которых 1 монография, 3 статьи в журналах, входящих в перечень ВАК Минобрнауки России, 2 статьи и 1 тезисы в журналах, представленных в международных базах данных Scopus и Web of Science. По результатам исследования получено 3 патента на изобретения (патент № 2662059 от 28.12.2017, патент № 2674334 от 28.12.2017 и патент № 2677331 от 28.12.2017).

**Объем и структура диссертации.** Диссертация изложена на 215 страницах машинописного текста, содержит 78 таблиц и 76 рисунков; состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, 5 глав собственно экспериментальных исследований, общих выводов и приложения. Список литературы содержит 216 источников, из них 40 – на иностранном языке.

**Во введении** сформулированы актуальность темы, цель и задачи исследования, определены научная новизна и практическая значимость работы.

**В первой главе** рассмотрены химический состав, фармакологические свойства и применение витаминных сборов №1 и №2 и их компонентов, также описаны способы получения и методы контроля качества водных и спиртовых извлечений из ЛРС; современные методы качественного и количественного анализа БАВ в ЛРС, таких как свободные органические кислоты, кислота аскорбиновая, фенольные соединения (флавоноиды, антоцианы, дубильные вещества и др.) и каротиноиды.

**Во второй главе** приведена характеристика изучаемых объектов – ЛРС и растительных препаратов, дано краткое описание методов анализа, приборов и реактивов, применяемых в работе и статистической обработки результатов анализа.

**В третьей главе** описаны результаты морфолого-анатомического изучения плодов смородины черной, шиповника, рябины обыкновенной и витаминных сборов №1 и №2, уточнены внешние признаки плодов.

**В четвертой главе** представлены результаты изучения подлинности и доброкачественности витаминных сборов №1 и №2 и их компонентов. Показано обоснование норм числовых показателей витаминных сборов и плодов смородины черной, шиповника, рябины обыкновенной. Представлены результаты идентификации свободных органических кислот и кислоты аскорбиновой методом

ТСХ и результаты исследований по идентификации органических кислот и флавоноидов методом ВЭЖХ в изучаемых объектах, а также результаты подтверждения подлинности витаминного сбора №1 и плодов шиповника методом дифференциальной спектрофотометрии.

**В пятой главе** представлены результаты анализа витаминных сборов №1 и №2 и их компонентов. Изложены результаты по содержанию компонентов гидрофильной фракции (органических кислот, кислоты аскорбиновой, дубильных веществ, флавоноидов, антоцианов и полисахаридов); результаты исследований по разработке методик потенциометрического титрования, кулонометрического титрования и ВЭЖХ для определения суммы свободных органических кислот; результаты исследований по разработке методик дифференциальной спектрофотометрии для определения содержания суммы флавоноидов.

**Шестая глава** включает результаты исследования настоев из витаминных сборов и их компонентов. Показано преимущество применения разработанной методики потенциометрического титрования как в анализе ЛРС, так и в анализе настоев.

**В седьмой главе** представлены результаты по изучению возможности выпуска готовой лекарственной формы (ЛФ) – настойки витаминных сборов. Обоснован выбор оптимальной концентрации экстрагента для максимального извлечения БАВ; приведены результаты исследований токсичности, противомикробной и антимикотической активности водных и спиртовых извлечений из витаминных сборов №1 и №2; показано преимущество данной ЛФ перед традиционной (настои) в проявлении более выраженной антимикробной и антимикотической активности, большему содержанию основных БАВ и продолжительности хранения.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

### **Объекты и методы исследования**

Используемое сырье отвечает требованиям действующей нормативной документации фирм-производителей АО «Красногорсклексредства» и ООО Фирма «Здоровье» (табл.1).

Качественное обнаружение проводили методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) в восходящем токе растворителей (ОФС.1.2.1.2.0003.15 «Тонкослойная хроматография» ГФ XIII) при температуре 20°C с применением пластинок Sorbfil в

системах: этилацетат : ледяная уксусная кислота (80:20) (кислота аскорбиновая) и 95% этанол : аммиак концентрированный (16:4,5) (сумма органических кислот).

Таблица 1. Объекты исследования и их характеристики

Объекты исследования	Характеристика	Производитель / срок заготовки	Количество серий / образцов, собранных в разные годы	
Плоды шиповника	высушенные	промышленный образец – ООО «Фирма «Здоровье»	9	P N003750/01
				РУ № ЛСР-002623/09
				РУ №Р N001184/01
				№ партии 010117
Плоды рябины обыкновенной	высушенные	промышленный образец – АО «КРЛС»	8	P №ЛС-002720
				№ ЛСР-002521/07
Плоды смородины черной	высушенные	заготовленные в Брянской и Московской обл., в 2014 и 2017 гг.	7	
Витаминный сбор №1	высушенные	модельный образец	8	
Витаминный сбор №2	высушенные	модельный образец / промышленный образец - АО «КРЛС»	8	P № ЛСР-006437/08
Настои из витаминных сборов	Водное извлечение	готовили по методике ГФ XIII ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары»	20	
Настои из компонентов витаминных сборов	Водное извлечение	готовили по методике ГФ XIII ОФС.1.4.1.0018.15 «Настои и отвары»	16	
Настойки из витаминных сборов	Спиртовое извлечение	готовили методом перколяции, применяли в качестве экстрагента этанол 70, 50, 40% концентрации	22	
Настойки из компонентов витаминных сборов	Спиртовое извлечение	готовили методом перколяции, применяли в качестве экстрагента этанол 70, 50, 40% концентрации	17	

Для количественного анализа БАВ применяли следующие методы:

- титриметрический анализ с использованием индикатора для определения суммы органических кислот (ГФ XI «Плоды шиповника») и кислоты аскорбиновой (ОФС 42-0114-09 «Методы количественного определения витаминов»);
- йодатометрию для определения кислоты аскорбиновой;
- перманганатометрическое титрование для определения дубильных веществ ГФ XIII ОФС.1.5.3.0008.15;

- потенциометрическое титрование для определения суммы органических кислот (ГФ XIII ОФС.1.2.1.19.0002.15), установления рН водных и спиртовых извлечений с помощью рН-метра «Анион 4100»;
- кулонометрическое титрование для определения суммы органических кислот с помощью кулонометра «Эксперт-006» при силе тока 5 мА;
- высокоэффективную жидкостную хроматографию (ОФС.1.2.1.2.0005.15) для определения суммы органических кислот и флавоноидов с помощью жидкостного хроматографа Agilent 1100, оснащенного диодноматричным детектором, программно-аппаратным комплексом сбора и обработки результатов ChemStation;
- метод спектрофотометрии для определения содержания флавоноидов, антоцианов, каротиноидов и кислоты аскорбиновой на спектрофотометре «Lambda-950» Perkin Elmer, США (ГФ XIII изд., ФС.2.5.0002.15);
- гравиметрический анализ для определения полисахаридов (ГФ XIII ФС.2.5.0032.15).

Все реактивы, используемые в анализе были квалификации не ниже «чистые для анализа» (ч.д.а.).

При разработке методик в качестве стандартных образцов (СО) применяли: рутин (CAS 153-18-4,  $\geq 99,0\%$ ), лютеолин (CAS 497-70-3,  $\geq 99,5\%$ ), кислоту L-аскорбиновую (CAS 50-81-7,  $\geq 99,0\%$ ), кислоту сорбиновую (CAS 110-44-1,  $\geq 99,0\%$ ), кислоту лимонную (CAS 5949-29-1,  $\geq 99,5\%$ ), кислоту D,L-яблочную (CAS 6915-15-7,  $\geq 99,0\%$ ), кислоту фумаровую (CAS 110-17-8,  $\geq 99,0\%$ ), кислоту винную (CAS 87-69-4,  $\geq 99,5\%$ ) - производство Sigma-Aldrich, США.

Плотность настоек определяли в соответствии с фармакопейной статьей ОФС.1.2.1.0014.15 «Плотность» ГФ XIII (метод 1).

Определение противомикробной и антимикотической активности витаминных сборов №1 и №2 определяли диско-диффузионным методом в агаре на твердых питательных средах. В качестве тест-культур использовали штаммы микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и *Candida albicans*.

Валидацию разработанных методик анализа проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик», также Руководством по валидации методик анализа лекарственных средств (Н.В. Юргель и др., 2007).

Статистическую обработку экспериментально полученных данных проводили в соответствии с требованиями ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов эксперимента» ГФ РФ, с использованием критерия Стьюдента.

### Морфолого-анатомические исследования

Согласно требованиям современной НД контроль качества предусматривает морфолого-анатомическое изучение ЛРС. Внешние признаки ЛРС и сборов исследовались невооруженным глазом и с помощью 3D-лазерного сканирующего микроскопа OLYMPUS OLS 4100, при увеличении 5х, 10х и 20х. Анатомо-диагностические признаки ЛРС и сборов были установлены с помощью микроскопа NIKON ECLIPSE LV100N POL в проходящем и поляризованном свете. Измерения выполнялись с помощью 5х, 10х, 20х, 100х окуляр-микрометра. Результаты данного исследования вошли в разделы «Внешние признаки» и «Микроскопия» проектов ФС «Витаминный сбор №1», «Витаминный сбор №2» и «Смородины черной плоды».

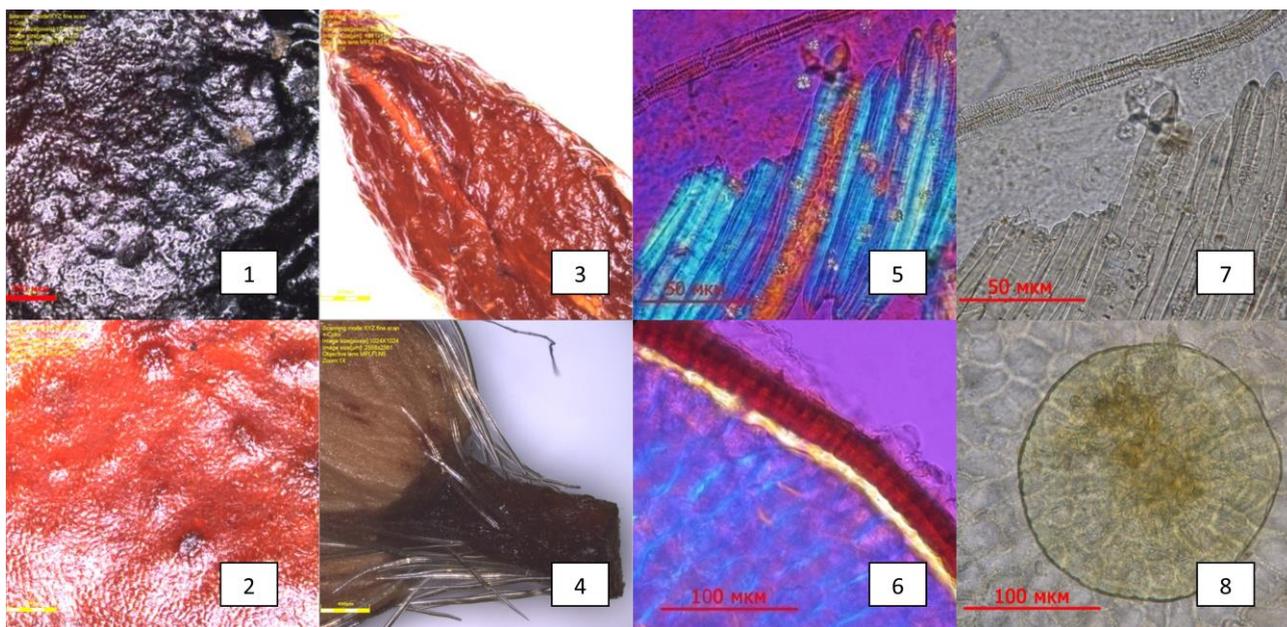


Рис.1. Морфолого-анатомические признаки

1-экзокарпий плодов ч. смородины (10х); 2-гипантий пл. шиповника (10х); 3-семя смородины (10х); 4-орешек пл. шиповника (5х); 5-стереом пл. смородины в поляризованном свете (проводящие пучки, «пакетообразный» эндокарп, друзы оксалата кальция); 6-срез семени пл. смородины в поляризованном свете; 7-стереом пл. смородины в проходящем свете; 8-эфиромасличная железка пл. смородины

Исследование витаминного сбора №1 при помощи сканирующего микроскопа дало возможность обнаружить следующие характеристики: поверхность фрагмента перикарпия (10х) сухого плода смородины черной блестящая, волнисто-морщинистая с заметным мелко-ячеистым строением экзокарпия, наблюдаются эфиромасличные

железки в виде желтоватых сморщенных мешочков размером 0,2 мм, выступающих над поверхностью экзокарпия, поверхность семени (10х) – матовая, покрыта гребневидными морщинами (рис.1); при исследовании фрагментов орешков плодов шиповника (5х) – на поверхности (на верхушке и у основания) наблюдается обилие простых волосков с гладкой поверхностью, заостренной верхушкой и блестящей полостью, наружная поверхность гипантия (10х) блестящая, мелко-ячеистая с углублениями и впадинами (рис.1). Показана возможность диагностики склеренхимных клеток и друз оксалата кальция с применением поляризованного света (рис.1) и перспектива включения этого метода в раздел «Микроскопия» НД.

### Качественный анализ сборов витаминных, их компонентов и препаратов

Согласно литературным данным, витаминные сборы №1 и №2 и их отдельные компоненты богаты органическими кислотами (лимонная, яблочная, щавелевая, изовалериановая, аскорбиновая) и фенольными веществами, которые составляют гидрофильную фракцию. Присутствие данных соединений было подтверждено в извлечениях из сборов, их компонентов и настоях.

Идентификацию органических кислот и кислоты аскорбиновой проводили методом ТСХ. На хроматограммах были обнаружены пятна абсорбции органических кислот соответствующие временам удерживания лимонной, яблочной кислот и аскорбиновой кислотам ( $R_f=0,5$ ;  $R_f=0,26$ ;  $R_f=0,69$  соответственно).

Для подробного изучения отдельных компонентов органических кислот применяли метод ВЭЖХ. Установлено, что сорбиновая кислота может быть предложена в качестве маркера на витаминный сбор №2 и плоды рябины обыкновенной (рис.2 и 3).

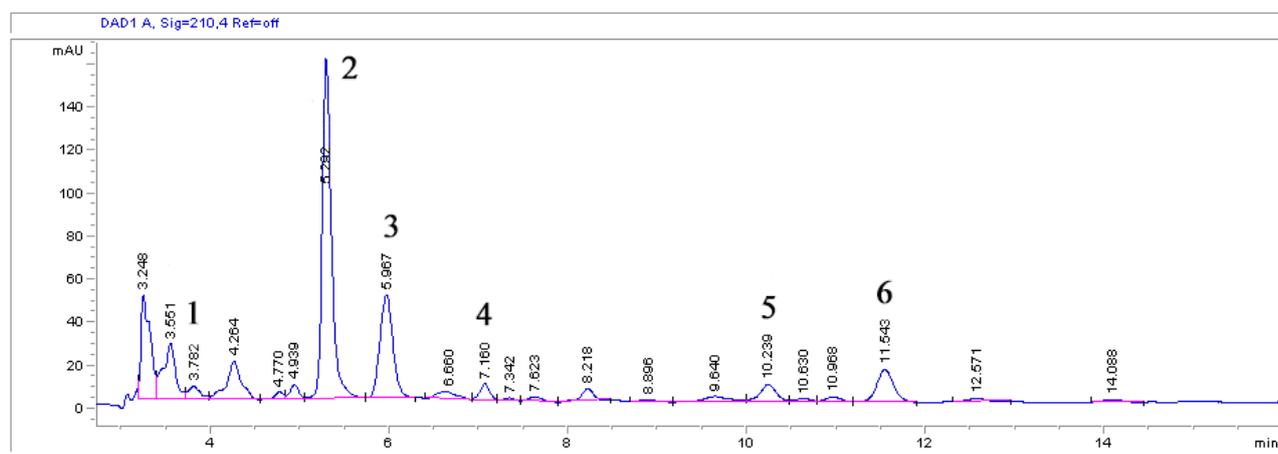


Рис.2. ВЭЖХ органических кислот в плодах рябины обыкновенной:  
1-винная, 2-яблочная, 3-аскорбиновая, 4-сорбиновая, 5-лимонная, 6-фумаровая

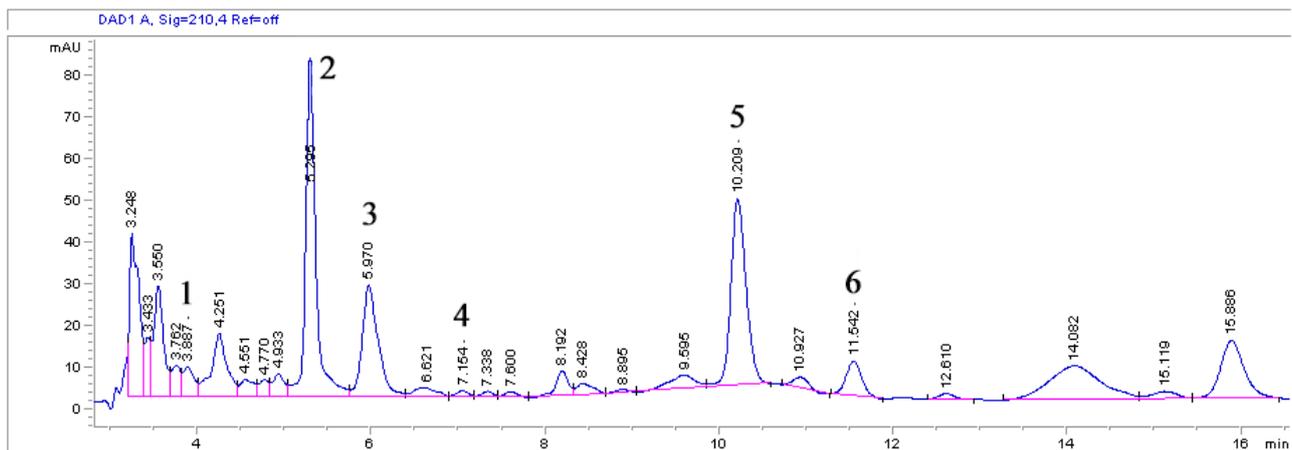


Рис.3. ВЭЖХ органических кислот в витаминном сборе №2:

1-винная, 2-яблочная, 3-аскорбиновая, 4-сорбиновая, 5-лимонная, 6-фумаровая

### Изучение флавоноидного состава витаминных сборов №1 и №2 и их компонентов

Проведено исследование содержания флавоноидов в витаминных сборах и их компонентах методом ВЭЖХ. В результате анализа установлено, что во всех плодах детектируются рутин, гиперозид, кверцетин, изокверцитрин, маркером для плодов рябины обыкновенной и витаминного сбора №2 является гликозид кверцетин-3-софорозид, для плодов черной смородины и витаминного сбора №1 – кемферол и его гликозиды, для плодов шиповника - кверцетин-пентозид и тилирозид (рис.4).

На следующем этапе были разработаны и валидированы методики спектрофотометрического определения флавоноидов в витаминных сборах и их компонентах в пересчете на рутин. Установлено, что создание значения рН в интервале 1,56-2,25 при проведении реакции комплексообразования флавоноидов с алюминия хлоридом способствует повышению селективности реакции по кето-группе кольца С и гидроксильной группе кольца А флавоноидов.

Доказана возможность идентификации плодов шиповника и сбора витаминного №1 по спектральным характеристикам совместно с количественным определением. На спектрах поглощения растворов плодов шиповника и витаминного сбора №1 обнаруживаются 3 максимума поглощения: при 323, 404, 526 нм и 311, 414, 540 нм соответственно. Полученные спектры представлены на рис.5.

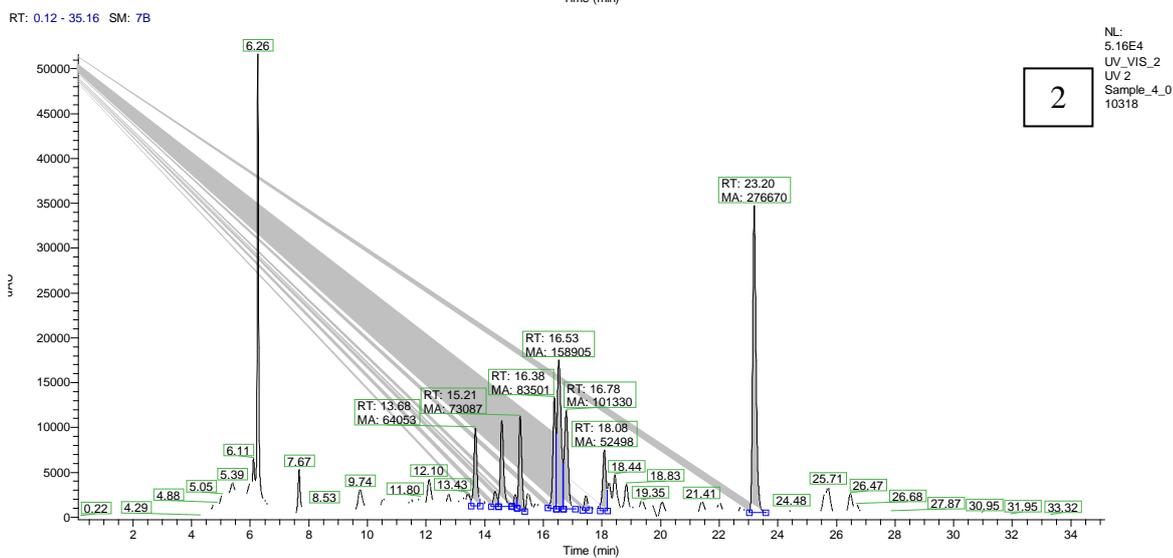
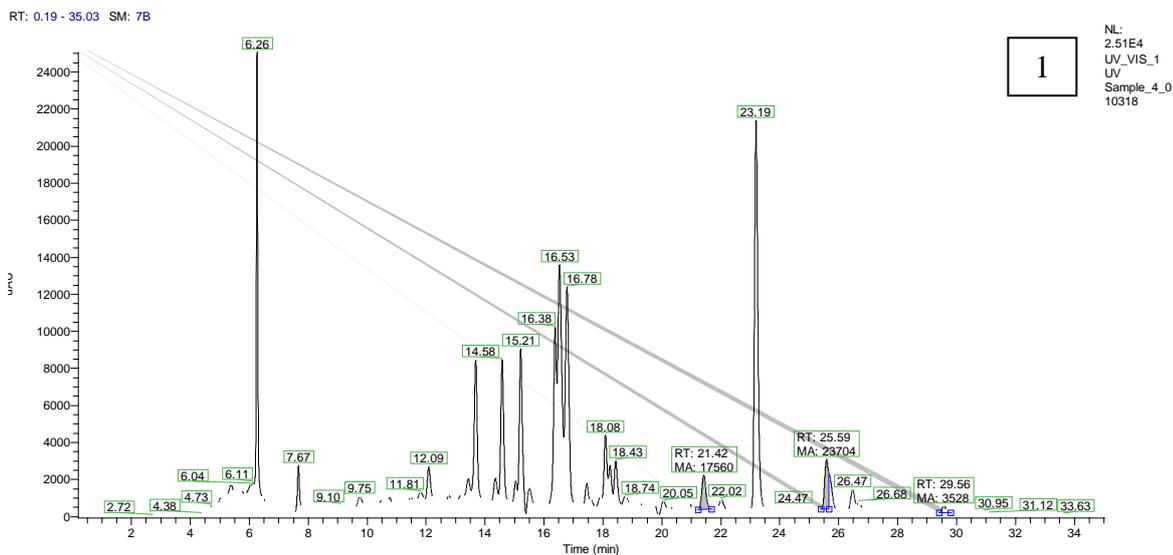


Рис.4. Флавоноидный профиль витаминного сбора №1

1-Хроматограмма извлечения из витаминного сбора №1 при  $\lambda=370$  нм (флавонолы);  
2- Хроматограмма извлечения из витаминного сбора №1 при  $\lambda=350$  нм (флавонолгликозиды)

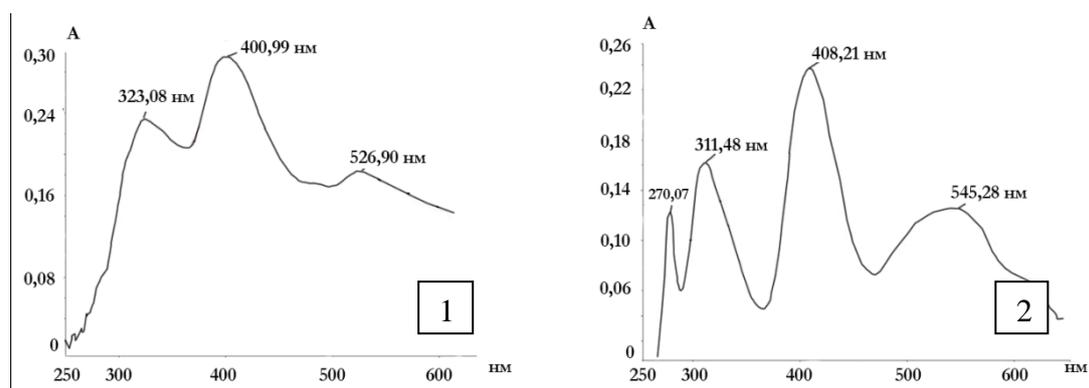


Рис.5. Дифференциальные спектры поглощения извлечений:

1-плодов шиповника, 2-витаминного сбора №1

Результаты количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в витаминных сборах и их компонентах и метрологические характеристики представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2. Содержание флавоноидов в витаминных сборах и компонентах в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье

$n=5; p=0,95$

Объект исследования	Содержание флавоноидов, %
Плоды рябины	0,093±0,002
Плоды черной смородины	0,102±0,004
Плоды шиповника	0,115±0,001
Витаминный сбор №1	0,074±0,001
Витаминный сбор №2	0,108±0,001

Таблица 3. Метрологические характеристики определения суммы флавоноидов в витаминных сборах №1 и №2

$n=5; p=0,95$

Объект исследования	$X_{cp}$	$S$	$\Delta x$	$\varepsilon$ %
Витаминный сбор №1	0,0744	0,001	0,001	1,61
Витаминный сбор №2	0,1079	0,001	0,001	0,67

### Определение содержания органических кислот в витаминных сборах и их компонентах

Был проведен ВЭЖХ – анализ на содержание индивидуальных органических кислот в исследуемых объектах. Данные по количественному содержанию отдельных органических кислот в объектах исследования представлены в таблице 4.

Таблица 4. Количественное содержание различных органических кислот в витаминных сборах №1 и №2 и их компонентах (ВЭЖХ)

$n=5; p=0,95$

Объект исследования	Содержание органических кислот, мг/г						Сумма кислот
	яблочная	сорбиновая	лимонная	фумаровая	винная	аскорбиновая	
Плоды шиповника	1,990	--	25,485	0,007	--	1,145	28,627
Плоды рябины обыкновенной	33,786	2,145	1,861	0,049	0,272	0,005	38,118
Плоды смородины черной	6,294	--	79,489	0,029	0,343	0,407	86,562
Витаминный сбор №1	4,082	--	50,343	0,012	0,289	0,332	55,058
Витаминный сбор №2	16,951	0,891	13,068	0,249	0,195	0,137	31,491

Согласно преобладанию различных кислот, нами было предложено проводить пересчет содержания суммы органических кислот в плодах шиповника, плодах смородины черной и витаминном сборе № 1 на лимонную кислоту, в плодах рябины обыкновенной и сборе витаминном №2 – на яблочную кислоту.

На следующем этапе были разработаны и валидированы методики потенциметрического и кулонометрического титрования органических кислот в сборах и их компонентах и проведено сравнение полученных результатов с данными анализа по методике ГФ XI (ФС «Плоды шиповника») (табл.5).

Показано, что методики потенциметрического и индикаторного титрования (ГФ) дают сходимые результаты как в анализе ЛРС, так и его настоев. Кулонометрическое титрование может быть использовано при анализе органических кислот в сырье, однако в случае с настоями дает заниженные результаты, вероятно, в связи с одновременно низкими концентрациями БАВ в этой лекарственной форме и малым объемом аликвоты. Ввиду более точного установления конечной точки титрования в окрашенных извлечениях потенциметрическим титрованием, показано преимущество этого метода.

Таблица 5. Содержание суммы органических кислот

$n=5; p=0,95$

Метод	Объект исследования	Пересчет на кислоту	Содержание суммы органических кислот, %	
			Сырье*	Настои
Индикаторное титрование	Плоды шиповника	лимонную	2,74±0,01	0,20±0,01
	Плоды рябины	яблочную	3,78±0,02	0,39±0,02
	Плоды смородины черной	лимонную	7,18±0,09	0,46±0,02
	Витаминный сбор №1	лимонную	4,02±0,07	0,27±0,01
	Витаминный сбор №2	яблочную	3,06±0,02	0,26±0,01
Потенциметрическое титрование	Плоды шиповника	лимонную	2,11±0,02	0,18±0,01
	Плоды рябины	яблочную	3,28±0,08	0,32±0,02
	Плоды смородины черной	лимонную	6,35±0,09	0,44±0,02
	Витаминный сбор №1	лимонную	3,47±0,06	0,26±0,01
	Витаминный сбор №2	яблочную	3,01±0,06	0,23±0,01
Кулонометрия	Плоды шиповника	лимонную	2,60±0,05	0,06±0,02
	Плоды рябины	яблочную	4,54±0,07	0,09±0,02
	Плоды смородины черной	лимонную	8,79±0,03	0,23±0,02
	Витаминный сбор №1	лимонную	6,31±0,05	0,14±0,01
	Витаминный сбор №2	яблочную	3,15±0,08	0,07±0,03

\* в пересчете на абсолютно сухое сырье

Одним из наиболее фармакологически значимых химических компонентов изучаемого ЛРС является аскорбиновая кислота. Содержание аскорбиновой кислоты устанавливали согласно методикам: индикаторного титрования с 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия (ГФ XI «Плоды шиповника») (табл.6).

Также в исследуемых субстанциях было определено содержание дубильных веществ, полисахаридов, каротиноидов и антоцианов (табл.6). Показано, что антоцианами, каротиноидами и кислотой аскорбиновой наиболее богаты плоды смородины, полисахаридами и дубильными веществами – плоды шиповника.

Таблица 6. Содержание различных БАВ в витаминных сборах №1 и №2 и их компонентах  
n=5; p=0,95

Метод анализа	Группа БАВ	Плоды шиповника	Плоды рябины	Плоды смородины черной	Витаминный сбор №1	Витаминный сбор №2
индикаторное титрование	аскорбиновая кислота, %	0,20±0,01	0,23±0,01	0,30±0,01	0,26±0,01	0,20±0,01
индикаторное титрование	дубильные вещества, %	3,24±0,01	2,37±0,02	1,75±0,09	3,63±0,07	4,48±0,02
гравиметрия	полисахариды, %	7,68±0,03	2,01±0,02	4,02±0,03	7,56±0,03	6,58±0,02
СФМ	антоцианы, %	0,173±0,001	0,609±0,001	0,934±0,005	0,589±0,003	0,490±0,004
СФМ	каротиноиды, мг%	0,029±0,001	0,018±0,001	0,058±0,001	0,019±0,001	0,030±0,001

### Получение настоек витаминных сборов и их анализ

Настойки получали методом перколяции с использованием в качестве экстрагента спирта этилового различных концентраций 40, 50 и 70%.

Данные по определению показателей качества и содержанию основных групп БАВ в настойках представлены в таблицах 7 и 8.

Таблица 7. Плотность настоек, полученных из витаминных сборов №1 и №2

Объект исследования	Концентрация этанола, %	Плотность настойки, г/мл	Сухой остаток, %
Витаминный сбор №1	70	0,8986	8,80
	50	0,9398	8,78
	40	0,9648	8,82
Витаминный сбор №2	70	0,8999	4,63
	50	0,9380	4,72
	40	0,9539	4,67

Было установлено, что оптимальная концентрация этанола для экстракции основных групп БАВ составляет 40%. Наибольшее количество аскорбиновой кислоты и суммы органических кислот обнаруживается в настойке из витаминного сбора №1, по содержанию флавоноидов и дубильных веществ настойки отличаются незначительно (табл.8).

Таблица 8. Содержание основных групп БАВ в настойках из витаминных сборов №1 и №2

$n=5; p=0,95$

Объект исследования	Концентрация этанола, %	Содержание основных групп БАВ в настойках, мг/мл			
		Сумма органических кислот	Аскорбиновая кислота	Дубильные вещества	Флавоноиды
Витаминный сбор №1	70	5,15±0,03	0,13±0,02	1,89±0,09	--
	50	7,50±0,04	0,17±0,02	2,81±0,03	--
	40	11,23±0,03	0,24±0,01	4,15±0,05	0,048±0,001
Витаминный сбор №2	70	3,11±0,03	0,08±0,02	3,78±0,03	--
	50	3,50±0,04	0,15±0,01	3,16±0,04	--
	40	4,17±0,04	0,11±0,01	3,56±0,07	0,050±0,002

#### Исследование токсичности, антимикробной и антимикотической активности настоев и настоек из витаминных сборов

При изучении антимикробной и антимикотической активности препаратов на основе витаминных сборов № 1 и № 2 использовали штаммы микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* и дрожжевых грибов *Candida albicans*. Экспериментально было установлено, что настои и предлагаемые нами настойки на основе витаминных сборов № 1 и № 2 обладают ингибирующей активностью по отношению к штаммам *Staphylococcus aureus* и *Candida albicans* (табл.9).

Таблица 9. Антимикробная и антимикотическая активности препаратов витаминных сборов

Объект исследования	Лекарственная форма	Зона задержки роста <i>St. aur.</i> , мм	ЕД настойки, в пересчете на бензилпенициллин	Зона задержки роста <i>C. alb.</i> , мм	Зона задержки роста <i>E.coli</i> , мм
Витаминный сбор №1	настой	15	375	9	0
	настойка 40 %	15	375	9	15
	настойка 50 %	15	375	10	16
	настойка 70 %	15	375	10	19
Витаминный сбор №2	настой	12	280	9	0
	настойка 40 %	12	280	9	15
	настойка 50 %	12	280	10	16
	настойка 70 %	12	280	10	19

В ходе эксперимента было установлено отсутствие ингибирующего действия

настоек витаминных сборов № 1 и № 2 по отношению к штамму *Escherichia coli*.

Показано, что настои из витаминных сборов не обладают токсичностью (индекс токсичности T=0). Ингибирующая активность этанола по отношению к штаммам: *St. aur.*: 40% - 7 мм, 50% - 8 мм, 70% - 8 мм; *S. alb.*: 40% - 6 мм, 50% - 7 мм, 70% - 7 мм; *E.coli*: 40% - 10 мм, 50% - 11 мм, 70% - 13 мм.

### **Разработка фармакопейных статей**

На основании проведенных исследований разработаны проекты фармакопейных статей: «Витаминный сбор №1», взамен ФС 42-2446-86, «Витаминный сбор №2», вводится впервые, и «Смородины черной плоды - *Ribes nigri fructus*», вводится впервые. В проекты ФС включены результаты подробного изучения макро- и микроскопических признаков, а также методики установления подлинности и потенциометрического титрования для установления содержания суммы органических кислот.

### **ВЫВОДЫ**

1. Проведены информационно-аналитические исследования по химическому составу компонентов витаминных сборов №1 и №2 и методов их качественного и количественного анализа.
2. Проведено углубленное морфолого-анатомическое изучение сборов и индивидуальных компонентов, показана возможность применения 3D-лазерного сканирующего микроскопа для изучения внешних признаков, и возможность диагностики лигнифицированных элементов с применением поляризованного света.
3. Методом ТСХ подтверждено присутствие в витаминных сборах и компонентах яблочной кислоты ( $R_f=0,66$ ), лимонной кислоты ( $R_f=0,1$ ) и кислоты аскорбиновой ( $R_f=0,69$ ). Методом ВЭЖХ были установлены в качестве маркеров индивидуальные соединения органических кислот и флавоноидов. Разработана методика СФМ для идентификации плодов шиповника и витаминного сбора №1.
4. Установлено количественное содержание основных групп БАВ в витаминных сборах и компонентах: суммы органических кислот, кислоты аскорбиновой и дубильных веществ.
5. Разработана и валидирована методика количественного определения суммы органических кислот методом потенциометрического титрования.

6. Разработаны методики и установлено содержание антоцианов, флавоноидов и каротиноидов в витаминных сборах и компонентах. Проведена валидация методики СФМ анализа на содержание суммы флавоноидов.
7. Изучен качественный и количественный состав водных (настои) и водно-спиртовых (настойки) извлечений витаминных сборов и их компонентов. Наибольшее количество аскорбиновой кислоты и суммы органических кислот обнаруживается в настойке из витаминного сбора №1, по содержанию флавоноидов и дубильных веществ настойки отличаются незначительно.
8. Разработаны и поданы в ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ России 3 проекта ФС: «Витаминный сбор №1» и «Витаминный сбор №2» и «Смородины черной плоды» для включения в Государственную Фармакопею РФ. По результатам исследования получено 3 патента на изобретения (патент № 2662059 от 28.12.2017, патент № 2674334 от 28.12.2017 и патент № 2677331 от 28.12.2017).

**Практические рекомендации.** Подходы к анализу сборов, предложенные в диссертации могут быть использованы при изучении других дву- и многокомпонентных растительных препаратов. При правильном подборе значения рН повышается селективность реакции комплексообразования флавоноидов с  $AlCl_3$ .

**Перспективы дальнейшей разработки темы.** Разработанные и усовершенствованные методики количественного определения флавоноидов, антоцианов и каротиноидов могут быть применены для анализа препаратов, содержащих экстракты плодов шиповника, рябины и смородины. Результаты исследования настоек витаминных сборов могут стать предпосылкой для выпуска данной лекарственной формы. Изучение токсичности, антимикробной и антимикотической активности в дальнейшем будет актуально в связи с развивающейся тенденцией поиска лекарственных препаратов, альтернативных антибиотикам.

#### **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. **Жилкина, В.Ю.** Изучение качественного и количественного содержания органических кислот в сборе витаминном / В.Ю. Жилкина, А.И. Марахова, Я.М. Станишевский // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2016. – №1(14). С. 156 – 159.

2. **Жилкина, В.Ю.** Исследования по стандартизации витаминных сборов из лекарственного растительного сырья: тезисы научно-практической конференции «Лекарственные растения ботанического сада», посвященной 70-летию Ботанического сада Первого МГМУ имени И.М. Сеченова / В.Ю. Жилкина, А.И. Марахова, Я.М. Станишевский // Издательство Первого МГМУ имени И.М. Сеченова. – М., 2016. – С. 44 – 46.
3. Qualitative and quantitative contents of organic acids in multivitamin plant raw materials studied using various physicochemical methods / A.I. Marakhova, **V.Yu. Zhilkina**, E.V. Sergunova [et al.] // Russian Chemical Bulletin. – Springer US, 2016. – Vol.65, – No.11. – pp. 2779–2782 (**Scopus, Web of Science, Springer**).
4. **Жилкина, В.Ю.** Количественное определение дубильных веществ в витаминных сборах: тезисы IV Международной научно-практической конференции «Научно-технический прогресс: актуальные и перспективные направления будущего» / В.Ю. Жилкина, А.И. Марахова // Кемерово. – 2016. – Т.2. – С. 93 – 94.
5. Получение настоек из витаминных сборов и исследования по их стандартизации: тезисы V научно-практической конференции «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» / **В.Ю. Жилкина**, А.И. Марахова, А.А. Сорокина [и др.] // Москва. – 2017. – С. 78 – 81.
6. **Жилкина, В.Ю.** Применение титриметрических методов для стандартизации витаминных сборов и препаратов, получаемых из них: материалы XXIV Российского национального конгресса «Человек и лекарство» / В.Ю. Жилкина, А.И. Марахова // Москва. – 2017. – С. 95 – 96.
7. **Жилкина, В.Ю.** Стандартизация настоек из витаминных сборов по основным группам действующих веществ: материалы VII Всероссийской конференции с международным участием «Новые достижения химии и химической технологии растительного сырья» / В.Ю. Жилкина, А.И. Марахова // Барнаул. – 2017. – С. 255 – 257.
8. Изучение качественного и количественного содержания биологически активных веществ в витаминном сборе крапивы и рябины (обзорная статья) / **В.Ю. Жилкина**, И.А. Ефимова, А.И. Марахова [и др.] // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2017. – №2(19). – С. 108 – 115.

9. Изучение антимикробной и антимикотической активности витаминных сборов и препаратов на их основе / **В.Ю. Жилкина**, Н.П. Сачивкина, А.И. Марахова [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2017. – №5. – С. 124 – 131. Режим доступа: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=26931>.
10. Разработка методик количественного анализа флавоноидов в витаминных сборах №1 и №2 / **В.Ю. Жилкина**, А.И. Марахова, А.А. Сорокина [и др.] // **Фармация**. – 2018. – №1 (**Web of Science** (Biosis)).
11. Screening study of medicinal plant raw materials for antimicrobial and antimycotic activity / **V. Zhilkina**, S. Panov, Z. Velikhanova [et al.] // FEBS Open Bio 8 (Suppl. S1). FEBS Press and John Wiley & Sons Ltd., 2018. – pp.236 – 236 (**Web of Science**).

### Монографии

1. Марахова, А.И. Физико-химические методы в анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на растительной основе: монография / А.И. Марахова, А.А. Сорокина, **В.Ю. Жилкина** – Типография «Ваш формат». – М., 2017. – 308 с.

### Патенты

1. Способ спектральной идентификации плодов шиповника и витаминного сбора: пат. 2662059 РФ: МПК G01N33/00 / **Жилкина В.Ю.**, Марахова А.И., Копылов В.В. [и др.]; заявитель и патентообладатель – РУДН. – заявл. 28.12.2017; опубл. 23.07.2018. – 8 с.
2. Средство, обладающее антимикробным и антимикотическим действием: пат. 2674334 РФ: МПК А61К 36/738, А61Р 31/04, А61Р 31/10 / **Жилкина В.Ю.**, Сачивкина Н.П., Марахова А.И. [и др.]: заявитель и патентообладатель – РУДН – заявл. 28.12.2017; опубл. 07.12.2018. – 8 с.
3. Средство, обладающее антимикробным и антимикотическим действием: пат. 2677331 РФ: МПК А61К 36/73; А61К 31/375; А61Р 31/04 / **Жилкина В.Ю.**, Сачивкина Н.П., Марахова А.И. [и др.]: заявитель и патентообладатель РУДН – заявл. 28.12.2017; опубл. 16.01.2019. – 8 с.