

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ХИМИКО-
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи



Сулоев Иван Сергеевич

Фармакогностическое изучение травы золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) как перспективного источника природных соединений с прогнозируемой фармакологической активностью

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация

на соискание учёной степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
кандидат биологических наук, доцент
Лужанин Владимир Геннадьевич

Санкт-Петербург – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	5
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	13
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1. Географическое распространение, систематическая и ботаническая характеристика рода <i>Solidago</i>	15
1.2. Сравнение морфолого-анатомических особенности представителей рода <i>Solidago</i>	16
1.3. Химический состав травы <i>Solidago canadensis</i>	20
1.4. Биологическая активность видов рода <i>Solidago</i> и их применение в медицине.....	27
Выводы к главе 1.....	29
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	30
2.1. Материалы исследования.....	30
2.2. Методы исследования.....	31
2.2.1. Методы фитохимического анализа.....	31
2.2.2. Экстрагирование сырья, получение фракций и подфракций.....	33
2.2.3. Хроматографические методы анализа.....	34
2.2.3.1. Бумажная хроматография.....	34
2.2.3.2. Тонкослойная хроматография.....	35
2.2.3.3. Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ)	35
2.2.3.4. Аналитическая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)	36
2.2.3.5. Препаративная высокоэффективная жидкостная хроматография.....	36
2.2.4. Масс-спектрометрия высокого разрешения.....	37
2.2.5. ЯМР-спектроскопия.....	37
2.2.6. Методы товароведческого анализа.....	37
2.2.7. Методы макро- и микроскопического анализа.....	38

2.2.8. Количественное определение флавоноидов в сырье.....	39
Глава 3. ТОВАРОВЕДЧЕСКИЙ И ОБЩИЙ ФИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТРАВЫ <i>SOLIDAGO CANADENSIS</i>	42
3.1. Определение товароведческих показателей травы <i>Solidago canadensis</i>	42
3.2. Общий фитохимический анализ травы <i>Solidago canadensis</i> на основные группы биологически активных веществ.....	44
Выводы к главе 3.....	47
Глава 4. ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ТРАВЫ <i>SOLIDAGO CANADENSIS</i> ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ.....	48
4.1. Бумажная хроматография.....	48
4.2. Тонкослойная хроматография.....	51
4.3. Высокоэффективная тонкослойная хроматография.....	53
4.4. Аналитическая высокоэффективная жидкостная хроматография.....	56
Выводы к главе 4.....	62
Глава 5. ВЫДЕЛЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ТРАВЫ <i>SOLIDAGO CANADENSIS</i> МЕТОДОМ ПРЕПАРАТИВНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ИХ ИДЕНТИФИКАЦИЯ	63
Выводы к главе 5.....	77
Глава 6. РАЗРАБОТКА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ <i>SOLIDAGO CANADENSIS</i>	78
6.1. Подбор условий экстракции флавоноидов из сырья.....	80
6.2. Проверка воспроизводимости методики количественного определения.....	87
6.3. Валидация методики количественного определения.....	88
Выводы к главе 6.....	93
Глава 7. МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ И АНАТОМО-ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТРАВЫ <i>SOLIDAGO CANADENSIS</i>	94
7.1. Морфологическое описание травы <i>Solidago canadensis</i>	94

7.2. Анатомическое описание травы <i>Solidago canadensis</i>	94
Выводы к главе 7.....	102
Глава 8. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДИУРЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА <i>SOLIDAGO CANADENSIS</i> И ОТДЕЛЬНЫХ ЕГО КОМПОНЕНТОВ. КОМПЬЮТЕРНЫЙ ПРОГНОЗ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВЫДЕЛЕННЫХ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ	103
8.1. Сравнительное исследование диуретической активности экстракта <i>Solidago canadensis</i> и отдельных его компонентов	103
8.2. Компьютерный прогноз фармакологической активности выделенных индивидуальных веществ	108
Выводы к главе 8.....	116
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	118
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	120
ПРИЛОЖЕНИЕ.....	133

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

В настоящее время одно из ключевых мест в экономическом сегменте большинства стран принадлежит фармацевтической отрасли [15]. Постоянный рост темпов развития науки и потребность в эффективных и безопасных лекарственных препаратах вынуждает учёных заниматься поиском и разработкой новых субстанций, отвечающих этим требованиям. При этом часто предпочтение отдаётся лекарственному растительному сырью как источнику тех субстанций, которые обладают рядом конкурентных преимуществ: комплексностью фармакологического действия, сравнительно низкой токсичностью, возможностью длительного применения [24]. Большая ресурсная база на территории России в совокупности с накопленным объёмом знаний в области фармакогнозии, фитотерапии и этнофармакологии позволяет отечественным учёным динамично развивать фармацевтическую отрасль. В связи с этим изучение лекарственного растительного сырья по-прежнему остается актуальной задачей для современной фармацевтической науки.

Препараты на основе растительного сырья, обладающие комплексным антибактериальным, диуретическим, литолитическим и противовоспалительным действием, играют важную роль в терапии мочекаменной болезни [8, 41]. Подобные фармакологические эффекты в совокупности часто встречаются у представителей семейства Астровые (*Asteraceae* L.), и одним из перспективных представителей этого семейства является род Золотарник (*Solidago* L.).

Наиболее известным видом рода Золотарник является золотарник канадский (*Solidago canadensis* L.). Это растение имеет широкий ареал обитания, многокомпонентный химический состав (более 150 соединений) и активно используется в медицине. Экстракты и настои, полученные из травы золотарника канадского, входят в ряд комплексных препаратов, таких как «Марелин» (Украина) и «Фитолизин» (Польша), применяемые для лечения

фосфатного и оксалатного нефроуролитиаза, пиелонефрита, а также при профилактике рецидивов после самостоятельного отхождения почечных камней или их оперативного удаления, и «Простанорм» (Российская Федерация), рекомендованного в качестве средства с противовоспалительным эффектом для нормализации диуреза и лечения хронического неспецифического простатита у взрослых.

С учётом возможностей современных физико-химических методов анализа (ВЭЖХ, ГХ, масс-спектрометрия, ЯМР-спектроскопия, препаративная ВЭЖХ) представляется актуальным углублённое изучение компонентного состава биологически активных веществ травы *Solidago canadensis*, проведение фармакогностического анализа с установлением диагностических показателей качества используемого сырья, а также выделение индивидуальных веществ из экстракта *Solidago canadensis* в чистом виде как потенциальных лекарственных молекул с прогнозируемой фармакологической активностью.

Работа была выполнена на кафедре фармакогнозии Санкт-Петербургского государственного химико-фармацевтического университета в соответствии с государственным заданием «Разработка технологий культивирования лекарственных растений и технологий получения индивидуальных веществ из растительного сырья». Исследования по микроскопии проводились на базе лаборатории анатомии и морфологии Ботанического института РАН им В.Л. Комарова. Исследования с использованием приборных хроматографических и спектроскопических методов выполнены в Центре контроля качества лекарственных средств СПХФУ. Масс-спектры высокого разрешения и спектры ЯМР были сняты в ресурсном образовательном центре СПбГУ.

Степень разработанности темы исследования

Solidago canadensis ранее подвергался фармакогностическому изучению. Сведения о контроле качества для травы *Solidago canadensis* представлены в Европейской и Британской травяной фармакопеях. В СССР

была разработана фармакопейная статья ФС 42-2777-91 «Трава золотарника канадского (*Herba Solidaginis canadensis*)» [33], однако на настоящий момент данный документ во многом утратил свою актуальность и нуждается в переработке и дополнениях в соответствии с современными требованиями к нормативной документации на официальное лекарственное растительное сырьё. Кроме того, современные физико-химические методы анализа позволяют актуализировать данные по фитохимическому составу указанного сырья, а также рассмотреть индивидуальные вещества в качестве потенциальных лекарственных кандидатов.

Цель диссертационной работы

Целью работы является проведение фармакогностического анализа травы *Solidago canadensis* с применением современных физико-химических методов, а также стандартизация и обоснование перспективы использования травы *Solidago canadensis* в качестве источника индивидуальных соединений с потенциальной фармакологической активностью.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие задачи:

- 1) Провести анализ современных литературных данных о химическом составе *Solidago canadensis*;
- 2) Выделить индивидуальные вещества из травы *Solidago canadensis* методом препаративной ВЭЖХ и установить их химическую структуру методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии высокого разрешения;
- 3) Разработать методику количественного определения основной группы биологически активных веществ (флавоноидов) в траве *Solidago canadensis* и определить их содержание в различных органах с целью установления оптимальных параметров сырья для заготовки;
- 4) Провести морфологическое и анатомо-диагностическое изучение травы *Solidago canadensis*. На основании полученных данных актуализировать требования к качеству сырья *Solidaginis canadensis herba*;

5) Провести изучение диуретической активности экстракта *Solidago canadensis* и отдельных фитокомпонентов *in vivo*, а также осуществить прогноз вероятного спектра фармакологической активности выделенных индивидуальных веществ *in silico*.

Научная новизна исследования

Уточнена схема и разработана методика выделения индивидуальных соединений из травы *Solidago canadensis*. Впервые из травы *Solidago canadensis* методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии выделены в чистом виде кверцетин, рутин, кверцетин-3-O- β -D-6''-ацетилглюкопиранозид и нарциссин. Актуализирована и экспериментально обоснована методика количественного определения суммы флавоноидов в траве *Solidago canadensis*, а также впервые изучено распределение флавоноидов в различных органах надземной части растения. Уточнено и дополнено морфологическое описание для отдельных органов и частей золотарника канадского (лист, стебель, трубчатый цветок, ложноязычковый цветок), а также уточнены микроскопические диагностические признаки указанного сырья. Впервые был проведён сравнительный эксперимент по исследованию диуретической активности экстракта травы *Solidago canadensis* и его двух основных компонентов – рутина и кверцетина. Впервые выполнен компьютерный прогноз вероятного спектра фармакологической активности отдельных индивидуальных веществ, выделенных из травы *Solidago canadensis*.

Теоретическая и практическая значимость диссертационной работы

Усовершенствованная методика количественного определения суммы флавоноидов, установленные параметры сырья для заготовки и диагностические микроскопические признаки сырья будут использованы для внесения дополнений в проект ФС «Золотарника канадского трава – *Solidaginis canadensis herba*».

Изучены теоретические основы выделения индивидуальных фенольных соединений, уточнённая методика выделения индивидуальных веществ из травы *Solidago canadensis* позволяет существенно снизить потери выделяемых компонентов за счёт уменьшения количества стадий процесса выделения и может стать основой для создания промышленных регламентов получения фармацевтических субстанций из растительного сырья. Результаты исследования по выделению индивидуальных соединений из указанного сырья и изучению их фармакологической активности методами *in vivo* и *in silico* позволяют рассматривать выделенные фитоконпоненты в качестве потенциальных лекарственных кандидатов.

Методика выделения индивидуальных соединений растительного происхождения – потенциальных фармакологических субстанций, относящихся к классам флавоноидов (производных кверцетина) внедрена в учебный (акт от 01 декабря 2022 г.) и научно-исследовательский процесс ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России (акт от 02 декабря 2022 г.), также в производство АО «Фармпроект» (акт от 28 ноября 2022 г.).

Методология и методы исследования

Исследование проводилось в период с 2016 по 2021 гг. с использованием современных физико-химических методов анализа: ВЭТСХ, ВЭЖХ-УФ, препаративная ВЭЖХ, ЯМР-спектроскопия и масс-спектрометрия высокого разрешения. Также использовались методы световой и сканирующей электронной микроскопии, УФ-спектрофотометрии, методы прогнозирования и изучения фармакологической активности *in silico* и *in vivo*. Теоретическую основу исследования составляли труды зарубежных и отечественных учёных по фитохимическому анализу вторичных метаболитов травы *Solidago canadensis*. Методология исследования заключалась в выделении индивидуальных веществ из травы *Solidago canadensis* и установлении их химической структуры, фитохимическом, анатомо-морфологическом, фармакологическом исследовании и стандартизации лекарственного растительного сырья.

Основные положения, выносимые на защиту

- 1) Результаты фармакогностического анализа травы *Solidago canadensis*;
- 2) Методика выделения индивидуальных фенольных соединений из травы *Solidago canadensis* с применением метода препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии;
- 3) Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве *Solidago canadensis* и её валидация;
- 4) Результаты сравнительного изучения диуретической активности экстракта травы *Solidago canadensis* и её основных фитокомпонентов;
- 5) Данные компьютерного прогноза вероятного спектра фармакологической активности отдельных фитокомпонентов травы *Solidago canadensis*.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность полученных результатов обусловлена соответствием используемых методов поставленным задачам с учётом особенностей изучаемого объекта, воспроизводимостью полученных результатов и применением методов статистической обработки данных.

Основные положения работы изложены на следующих конференциях:

- 1) Всероссийская научная конференция студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, СПХФА, 2017-2019 гг);
- 2) Международный конгресс «Фитофарм» (Грац (Австрия) 2017), (Хорген (Швейцария) 2018), (Санкт-Петербург (Россия) 2019);
- 3) Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Инновации в здоровье нации» (Санкт-Петербург, СПХФА, 2017);
- 4) IV Российско-Финский симпозиум «Опыт сотрудничества ВУЗов и фармацевтических компаний по созданию новых лекарственных препаратов» (Санкт-Петербург, 2017);

5) V Российско-Финский симпозиум «Технологии будущего и основные направления создания новых лекарственных препаратов» (Турку (Финляндия), 2018);

6) IV Международная научно-методическая конференция «Гаммермановские чтения» (Санкт-Петербург, СПХФУ, 2019);

Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов

Работа представляет собой самостоятельный научный труд автора и включает его исследования за период с 2016 по 2021 годы.

Во всех работах, выполненных в соавторстве, вклад автора выражается участием в сборе, определении и паспортизации сырья, постановке и выполнении экспериментальных опытов по выделению и идентификации природных соединений физико-химическими и хроматографическими методами, проведению товароведческих, микроскопических исследований, а также обобщении и систематизации полученных результатов.

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 12 научных работ, включая 1 статью в журнале Scopus, 1 статью в журнале Web of Science и 2 статьи в журналах перечня рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации, рекомендованных ВАК Минобрнауки России.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательских работ федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, в рамках тематики государственного задания «Разработка методологической концепции контроля качества лекарственных средств и субстанций природного происхождения с

использованием инновационных аналитических методов» (регистрационный номер АААА-А20-120121790032-2 от 17.12.2020 г.).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения работы соответствуют паспорту специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно пункту 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 объем научно-квалификационной работы

Работа изложена на 136 страницах машинописного текста, иллюстрирована 39 рисунками и 30 таблицами. Диссертационная работа состоит из введения, 8 глав (обзор литературы, материалы и методы и 6 глав, содержащих результаты экспериментальных исследований), заключения, приложения, списка сокращений и списка литературы, включающего 93 источника, из них 51 на иностранных языках.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БАД – биологически активная добавка;
- БХ – бумажная хроматография;
- БУВ – хроматографическая система «бутанол: уксусная кислота: вода»;
- ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
- ВЭЖХ-МС - высокоэффективная жидкостная хроматография в сочетании с масс-спектроскопическим анализом;
- ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография;
- ГФ – Государственная фармакопея;
- ГХ – газовая хроматография
- ЗК – золотарник канадский;
- ЛРС – лекарственное растительное сырьё;
- ОФС – общая фармакопейная статья;
- ПТСХ-П-В-УФ – пластины для тонкослойной хроматографии на полимерной основе, высокоэффективные, для проведения анализа в ультрафиолетовом спектре;
- РАН – Российская Академия Наук;
- СО – стандартный образец;
- СПБГУ – Санкт-Петербургский Государственный университет;
- СПХФУ – Санкт-Петербургский Химико-Фармацевтический университет;
- СЭМ – сканирующий электронный микроскоп
- ТУ – технические условия;
- ТСХ – тонкослойная хроматография;
- ТСХ-АФ-В – пластины для тонкослойной хроматографии на алюминиевой фольге высокоэффективные;
- ТФУ – трифторуксусная кислота;
- УК – уксусная кислота;
- УФ – ультрафиолетовый;

ФС – фармакопейная статья;

ЯМР – ядерный магнитный резонанс;

MCF-7 (Michigan Cancer Foundation-7) – эпителиоподобная линия
клеток рака груди;

PASS – Prediction of Activity Spectra for Substances;

R_f – фактор удерживания;

SC – (*Solidago canadensis*) – золотарник канадский;

TOF (Time of flight) – времяпролетный масс-анализатор

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Географическое распространение, систематическая и ботаническая характеристика рода *Solidago*

Род *Solidago* L. (золотарник) принадлежит к кладе *Asterids*, семейству *Asteraceae* L., подсемейству *Asteroideae* L. [93]. Русское название рода «золотарник» происходит от слова «золото». Латинское «*solidago*», по одной из версий, состоит из двух слов: «*solidum agere*», что означает «делать твердым, цельным, здоровым» [35], по другой, от «*solidus*» - солид (золотая монета) и «*ago*» - находящийся в состоянии [7].

Большинство представителей рода золотарник относятся к многолетним растениям высотой от 20 до 200 см. Нижняя часть стебля обычно не ветвится, с красноватым оттенком; к верхушке стебель разветвляется, формируя метельчатое соцветие. Многочисленные золотисто-желтые цветки собраны в корзинки. Очередные листья имеют остроконечную эллиптическую форму с зубчатым краем. К концу цветения листья часто становятся узкими, ланцетными с гладкими краями, а сформировавшийся хохолок способствует распространению плодов в ветреную погоду [85].

Большинство видов рода *Solidago* произрастает в Северной Америке и Евразии [73]. Растения рода *Solidago* широко представлены на территории России и стран СНГ. В настоящее время насчитывается около 26 видов этого рода, распространённых во флоре России [42]. В Европе отмечено присутствие 6 видов золотарника с доминированием золотарника обыкновенного (*Solidago virgaurea* L.) [50]. В мировой флоре род *Solidago* включает около 190 видов и внутривидовых таксонов (подвидов и разновидностей) с признанным статусом и около 330 видов и внутривидовых таксонов с неоднозначным статусом [86].

Золотарник канадский (*Solidago canadensis*) – многолетнее травянистое растение высотой до 150 см с хорошо развитой корневой системой, представленной корневищем с придаточными корнями [56,90]. Исторической родиной золотарника канадского являются регионы умеренного и

субтропического поясов Северной Америки (южная часть Канады, США, север Мексики) [49,79]. Впервые золотарник был интродуцирован в Европу в XVIII - XIX вв. в качестве декоративного растения, позднее достаточно успешно прижился и распространился [6,44]. Встречается от юга Скандинавии до Северной Италии. Помимо Европы, *Solidago canadensis* произрастает в Австралии, Японии, Новой Зеландии, на Тайване, в Закавказье и Сибири [14].

Золотарник канадский внесен в «Список инвазионных видов ЕРРО» как вид, наносящий ущерб аборигенным видам растений, окружающей среде и биологическому разнообразию [1]. Конкурируя в качестве сорняка с другими растениями, растение быстро расселяется и активно осваивает новые территории в Белоруссии, Венгрии, Китае и других странах [6,28,44,50].

На территории СССР *Solidago canadensis* культивировался с 1986 года для получения лекарственного растительного сырья для производства препарата «Марелин» [35]. В настоящее время *Solidago canadensis* имеет широкий ареал обитания и распространен по всей территории России в качестве декоративного и одичавшего вида. В европейской части России встречается на заброшенных полях, по окраинам населённых пунктов, в парках, вблизи дорог, по берегам рек, а также на приусадебных участках [17, 35]. Предпочитает открытые солнечные участки. Произрастает преимущественно на почвах от влажных до умеренно сухих, с нейтральным рН и средней питательной ценностью. Устойчив к избыточному увлажнению [19].

1.2. Сравнение морфолого-анатомических особенностей представителей рода *Solidago*

Ввиду того, что некоторые виды золотарника, распространённые на территории России и стран СНГ, имеют схожий ареал обитания, весьма остро встаёт вопрос их диагностики. Отличительные морфологические признаки для

трёх часто встречаемых видов (*Solidago canadensis*, *Solidago virgaurea* и *Solidago caucasica*) представлены в таблице 1 [29,37,50,52,61].

Таблица 1. Сравнительная морфологическая характеристика некоторых видов золотарника

Растение / Признак	<i>Solidago canadensis</i>	<i>Solidago virgaurea</i>	<i>Solidago caucasica</i>
Высота растения	До 150 см	15-100 см	30-70 см
Стебель	Прямостоячий, опушённый	Прямостоячий или слегка извилистый, в нижней части голый, в верхней слегка опушённый	Прямостоячий или слегка приподнимающийся при основании, опушённый
Подземные органы	Горизонтальное ветвистое корневище	Горизонтальное или косо восходящее корневище	Горизонтальное корневище
Листовая пластинка	В верхней части стебля яйцевидная, в нижней узколанцетная, с пильчатым краем	Яйцевидная или эллиптическая с пильчатым краем, слегка опушенная на адаксиальной стороне и густо опушенная на абаксиальной	Яйцевидная, с пильчатым краем

Соцветия и цветки (тип, размеры)	Метельчатое; корзинки на коротких (2-3 мм) ножках, без прицветников, диаметром 5-6 мм. Краевые цветки ложноязычковые, срединные – трубчатые, золотисто-жёлтые.	Метельчатое; корзинки на коротких (2-3 мм) ножках, с прицветниками, диаметром 8-10 мм. Краевые цветки ложноязычковые, с линейным трехзубчатым отгибом, срединные – трубчатые, буровато-жёлтые	Колосовидное; корзинки на очень коротких (1-2 мм) ножках, обычно без прицветников, диаметром 15-20 мм. Краевые цветки ложноязычковые, срединные – трубчатые, с золотистым оттенком
Обёртка	Колокольчатая, двухрядная	Колокольчатая, 4-б-рядная	Коническая, колокольчатая, двух- или трёхрядная

Представители рода *Solidago* в зависимости от ареала обитания цветут с середины июля до начала сентября. Плоды созревают в августе-октябре [1].

Согласно данным фармакопейной статьи ФС 42-2777-91 «Трава золотарника канадского (*Herba Solidaginis canadensis*)» [33] при анатомическом исследовании листьев диагностическое значение имеют форма клеток эпидермы (верхней – многоугольная с прямыми клеточными стенками, нижней – со слабоизвилистыми контурами, над жилками – клетки вытянутые с продольными складками кутикулы); устьица аномоцитного типа и простые волоски двух типов: крупные 4-5-клеточные, толстостенные, со складчатой кутикулой и заострённой конечной клеткой, заметно расширяющиеся к

основанию и часто коленчато-изогнутые, а также двухклеточные волоски, конечная клетка которых несколько вздута и имеет тонкий нитевидный вырост. Клетки эпидермы у основания волосков обычно образуют розетку [33]. Описание микроскопии стебля и цветков в этом нормативном документе отсутствует, однако в работе Сулеймановой Ф.Ш. и др. [27] имеются сведения о наличии в эпидерме стеблей золотарника устьиц аномоцитного типа и 3 типов волосков: толстостенных многоклеточных, простых тонкостенных многоклеточных и единичных головчатых многоклеточных. В цветках и листочках обёртки авторами были найдены вместилища, содержащие эфирное масло. Данные диагностические признаки авторами позже были указаны в проекте ФС «Золотарника канадского трава – *Solidaginis canadensis herba*».

При анатомическом исследовании *Solidago virgaurea* коллективом авторов Calalb T. et al. были выявлены структуры, имеющие определяющее значение для диагностики вида: для листа – 2 типа защитных трихом (конические многоклеточные и многоклеточные со спадающими клеточными стенками) и секреторные волоски, имеющие ножку из 1-2 клеток и одноклеточную железистую головку; для стеблевой части – наличие на поперечном сечении зон эпидермы, коры и центрального цилиндра, 2 типа защитных трихом, схожих по строению с трихомами листа, уголкового колленхима, коллатеральные открытые сосудистые пучки и секреторные каналы [52].

К основным анатомо-диагностическим признакам травы *Solidago caucasica* относятся клетки эпидермы листа с извилистыми стенками и слабо выраженной продольно-морщинистой кутикулой; наличие многочисленных простых многоклеточных остроконусовидных тонкостенных волосков с гладкой поверхностью и коротких железистых волосков на одно-двухклеточной ножке с одноклеточной головкой, располагающихся на обеих сторонах листа; эфирномасличные желёзки ярусного типа на эпидерме листочков обёртки; округлая пыльца с шиповатой поверхностью; чередование

участков колленхимы коры стебля с хлоренхимой и наличие хлоропластов в эндодерме [34,35,36].

1.3. Химический состав травы *Solidago canadensis*

Анализ отечественной и зарубежной литературы показал, что химический состав *Solidago canadensis* ранее был изучен достаточно подробно. В надземной части были обнаружены различные группы биологически активных веществ, основными из которых являются фенольные соединения (флавоноиды и их агликаны, фенолкарбоновые кислоты) и терпеноиды [3,60,76,86].

Состав комплекса фенольных соединений, содержащихся в траве *Solidago canadensis*, представлен в таблице 2.

Таблица 2. Характеристика состава фенольных соединений травы *Solidago canadensis*

№	Название соединения	Литературный источник
Фенолкарбоновые кислоты и их производные		
1	Ванилиновая кислота	[86]
2	Галловая кислота	[58,86]
3	Метилгаллат	[58]
4	Гидроксикоричная кислота	[35]
5	Изохлорогеновая кислота	[35]
6	Кофейная кислота	[35,47,48,58]
7	п-Кумаровая кислота	[58,86]
8	Сиреневая кислота	[58,86]
9	Феруловая кислота	[58,86]
10	Хлорогеновая кислота	[35,47,48,58,75]
11	Коричная кислота	[58]
12	Эллаговая кислота	[58]

Флавоноиды (агликоны)		
13	Катехин	[86]
14	Эпикатехин	[86]
15	Нарингенин	[58]
16	Таксифолин (дигидрокверцетин)	[58]
17	Гесперидин	[86]
18	Кемпферол	[35,48,58]
19	Изорамнетин	[35,48]
Гликозиды флавоноидов		
20	Астрагалин (кемпферол-3-О-β-D-глюкозид)	[35,48]
21	Афзелин (кемпферол-3-О-α-L-рамнозид)	[47]
22	Никотифлорин (кемпферол-3-О-α-L-рутинозид)	[35,47]
23	Гвайяверин (кверцетин-3-арабинозид)	[35]
24	Гиперозид (кверцетин-3-О-β-D-галактозид)	[47]
25	Изокверцитрин (кверцетин-3-О-β-D-глюкозид)	[47,48,57,75]
26	Кверцитрин (кверцетин-3-О-β-D-рамнозид)	[47]
27	Кверцетин-3-О-(6''-О-ацетил)-глюкопиранозид	[35,48]
28	Рутин (кверцетин-3-О-β-D рутинозид)	[35,47,48,75]
29	Изорамнетин-3-О-β-D-глюкозид	[35,48]
30	Изорамнетин 3-О-(6''-О-ацетил)-глюкопиранозид	[35]
31	Нарциссин (Изорамнетин-3-О-β-D-рутинозид)	[35,48]
32	Рамнетин-3-О-глюкорамнозид	[35]
Лигнаны		
34	Визанол	[66]
35	9-Формилвизанол	[66]
36	8-Дигидрометилвизанол	[66]
Прочие фенольные соединения		
37	Пирокатехин	[58]

В то же время зарубежными учёными отмечается разнообразие терпеноидного комплекса и компонентов эфирного масла, содержащихся во всех частях *Solidago canadensis* [65,68]. Данные о содержании терпеноидов и компонентов эфирного масла в различных частях *Solidago canadensis* отражены в таблице 3.

Таблица 3. Характеристика терпеноидного состава *Solidago canadensis*

№	Название соединения	Часть растения в которой было найдено вещество	Литературный источник
1	Аморфа-4,9-диен-2-ол	Цветки	[60]
2	δ-Аморфен	Цветки	[60,69]
3	Аристолен	Цветки	[65]
4	Аромадендрен	Цветки	[60]
5	2-α-ацетоксиаморфа-4,7(11)диен	Цветки	[60]
6	Борнеол	Цветки	[60]
7	Борнилен	Цветки	[65]
8	β-бурбонен	Цветки	[65]
9	Вербенол (<i>цис</i> -, <i>транс</i> -)	Цветки	[59,65]
10	Вертициол	Цветки	[65]
11	Гвайол	Цветки	[60]
12	n-гексадекановая кислота	Цветки	[65]
13	n-гексадеканол	Цветки	[60]
14	Гептатриакотанол	Цветки	[65]
15	Герма-4(15),5,10(14)-триен-1-α-ол	Цветки	[60]
16	Глобулол	Цветки	[65]
17	Гумулан-1,6-диен-3-ол	Цветки	[65]

18	Гурхунен (α -, γ -)	Цветки	[45,65]
19	<i>n</i> -докозан	Цветки	[60]
20	β -калакорен	Цветки	[60]
21	Кубебол	Цветки	[60]
22	Линалоол	Цветки	[65]
23	Линалоола оксид	Цветки	[65]
24	<i>p</i> -мент-1-ен-8-ол	Цветки	[65]
25	Метилгексадеканоат	Цветки	[60]
26	Неофитадиен	Цветки	[60]
27	Оцимен (<i>cis</i> - β -, <i>trans</i> (E)-)	Цветки	[59,60,65,76]
28	<i>n</i> -пентакозан	Цветки	[60]
29	Периллен	Цветки	[60]
30	Сейхелен	Цветки	[65]
31	Терпинен (α -, γ -)	Цветки	[59,65,68]
32	Терпинен-4-ол	Цветки	[59,60,65]
33	α -терпинеол	Цветки	[60]
34	Тетракозан	Цветки	[60,65]
35	<i>Транс</i> -2- изопропилбицикло[4.3.0]н он-3-ен-8-он	Цветки	[65]
36	<i>Транс</i> -лонгипинокарвеол	Цветки	[65]
37	<i>Транс</i> -муурола-4-(14),5- диен	Цветки	[60]
38	Трикозан	Цветки	[60]
39	6,10,14-триметил-2- пентадеканон	Цветки	[60]
40	Туйен	Цветки	[65]
41	Ундеканал	Цветки	[65]
42	Фитол	Цветки	[60,65]

43	Хузинола ацетат	Цветки	[60]
44	Циерон	Цветки	[65]
45	Циклоколоренон	Цветки	[45,60]
46	Циклосативен	Цветки	[65]
47	<i>n</i> -эйкозан	Цветки	[60]
48	Элемол	Цветки	[60]
49	9-эпи- <i>транс</i> -кариофиллен	Цветки	[60]
50	6-эпикубенол	Цветки	[60,65,69]
51	Эпоксиаллоаромадендрен	Цветки	[60]
52	Эремофилен	Цветки	[65]
53	2-этенил-1,1-диметил-3-метиленициклогексан	Цветки	[65]
54	Эудесма-4(15),7-диен-1-β-ол	Цветки	[60]
55	Иланген (α-, β-)	Цветки, корни	[60,76]
56	Кадинол (α-, <i>epi</i> -α, δ-, τ-)	Цветки, корни	[60,65,76]
57	Копаен (α-, β-)	Цветки, корни	[59,60,65,68,69,76]
58	β-копаен-4-α-ол	Цветки, корни	[60,76]
59	Кубенен (α-, β-)	Цветки, корни	[60,65,67,68,76]
60	γ-мууролен	Цветки, корни	[45,60,65,68,76]
61	Мууролол (α-, τ-)	Цветки, корни	[60,65,76]
62	Терпинолен	Цветки, корни	[60,65,76]
63	Цимен (<i>m</i> -, <i>p</i> -)	Цветки, корни	[59,76]
64	Элемен (α-, β-, δ-)	Цветки, корни	[57,59,60,65,68,69,76]
65	6β-ангелоилоксиковаленовая кислота	Трава	[72]
66	Аромадендрена оксид	Трава	[87]
67	Бициклогермакрен	Трава	[69]

68	Вербенон	Трава	[59]
69	α -гумулен	Трава	[45,69]
70	α -камфоленаль	Трава	[59,87]
71	Карвон	Трава	[59]
72	Кариофиллен (α -, β -)	Трава	[59,65,68,69,87]
73	Кариофиллена оксид	Трава	[45,87]
74	Кротоновая кислота	Трава	[72]
75	Лонгиспиногенин	Трава	[72]
76	Миртеналь	Трава	[59]
77	Мирцен (α -, β -)	Трава	[57,60,69,87]
78	Селинен (β -, γ -)	Трава	[68,69]
79	Сесквисабинен А	Трава	[59]
80	Солидагол	Трава	[72]
81	Спатуленол	Трава	[45,65,87]
82	α -терпинилацетат	Трава	[59]
83	6β - тиглоилоксиковаленовая кислота	Трава	[72]
84	<i>Транс</i> -2-гексенол	Трава	[69]
85	<i>Транс</i> -пинокарвеол	Трава	[59]
86	Феландрен (α -, β -)	Трава	[59,65,68,87]
87	2-этенил-1,1-диметил-3- метиленциклогексан	Трава	[59]
88	<i>Эти</i> - бициклосесквифеландрен	Трава	[59]
89	β -эудесмен	Трава	[87]
90	Борнилацетат	Трава, корни	[57,59,60,65,69,76,87]
91	Гермакрен (B-, D-)	Трава, корни	[57,59,60,67,69,76,87]
92	Кадинен (α -, γ - δ -)	Трава, корни	[59,65,69,76]

93	Камфен	Трава, корни	[59,65,68,69,76,87]
94	Лимонен	Трава, корни	[45,57,59,60,65,68,69,76,87]
95	Пинен (α -, β -)	Трава, корни	[57,59,60,65,68,69,76,87]
96	Сабинен	Трава, корни	[59,76,87]
97	α -бисаболен	Корни	[76]
98	Дезоксисолидагенон	Корни	[92]
99	α -зингиберен	Корни	[76]
100	Изоледен	Корни	[57,76]
101	Кубенан-11-ол	Корни	[76]
102	γ -куркумен	Корни	[76]
103	Метилловый эфир карвакрола	Корни	[76]
104	Микрен	Корни	[76]
105	α -муурол	Корни	[76]
106	Муурол-4,10(14)-диен-1- β -ол	Корни	[76]
107	(E)-неролидол	Корни	[76]
108	Солидагенон	Корни	[92]
109	Тимол	Корни	[76]
110	Метилловый эфир тимола	Корни	[76]
111	<i>Транс</i> - α -бергамотен	Корни	[76]
112	<i>Транс</i> -карвеол	Корни	[59,76]
113	Хуненол	Корни	[76]
114	β -цедрен-9-он	Корни	[76]
115	1,8-цинеол	Корни	[76]
116	Эремолигенол	Корни	[76]

117	9,13,15,16-бисэпокси- лабдан-7-ен-6,15-дион	Корни	[92]
118	13-эпи-9,13,15,16- бисэпокси-лабдан-7-ен- 6,15-дион	Корни	[92]
119	15,16-эпокси-лабдан-7,13- диен-6,16-дион	Корни	[92]
120	15-этокси-9,13,15,16- бисэпокси-лабдан-7-ен-6- он	Корни	[92]
121	13-эпи-15-этокси- 9,13,15,16-бисэпокси- лабдан-7-ен-6-он	Корни	[92]
122	15,16-эпокси-лабдан-7,13- диен-6,15-дион	Корни	[92]

1.4. Биологическая активность видов рода *Solidago* и их применение в медицине

Разнообразие химического состава обуславливает широкий спектр фармакологической активности представителей рода *Solidago*.

Научные исследования Л.Н. Савченко с соавторами посвящены противовоспалительному и диуретическому действию жидкого экстракта *Solidago canadensis* [22]. Опыты проводились на беспородных крысах-самцах. В обоих случаях экспериментально было доказано наличие этих эффектов, сопоставимых по величине с известными препаратами аналогичных групп: бутационом и фуросемидом соответственно.

В работе Deng Y. et al. представлены данные по антимикробной и антиоксидантной активности этанольных экстрактов, полученных экстрагированием образцов сырья, заготовленных в различные фазы развития

растений [56]. Эти два эффекта автор напрямую связывает с содержанием в сырье таких фенольных соединений, как флавоноиды и танинды.

Данные о наличии противоопухолевой активности хлороформного и водно-спиртового 50% экстракта *Solidago canadensis* в отношении клеток линии HeLa и MCF-7 приведены в работе Ravichandiran V. и Deera N [83]. Ранее противоопухолевая активность в отношении простаты, рака молочной железы, меланомы и рака легких была также отмечена у золотарника обыкновенного [63].

Согласно данным официальной медицины, сухой экстракт из травы *Solidago canadensis*, обладает противовоспалительным, диуретическим, антибактериальным, нефролитическим, гипоазотемическим и спазмолитическим эффектами [25]. Известно, что экстракты и настои, полученные из травы *Solidago canadensis*, входят в ряд комплексных препаратов, таких как «Марелин», «Простанорм» и «Фитолизин» [28,35] и применяются при лечении и профилактике заболеваний мочеполовой и сердечно-сосудистой систем организма: фосфатного и оксалатного нефроуролитиаза, хронического простатита, аденомы простаты, мочекаменной болезни, цистита, уретрита и уретрального синдрома.

В медицинской практике в качестве лекарственного растительного сырья используется трава некоторых видов золотарника. Наибольшее количество сведений имеется о применении в медицине золотарника канадского, золотарника обыкновенного, золотарника гигантского и золотарника чилийского. Так, известно о применении сырья золотарника обыкновенного для лечения инфекционных (цистита) и функциональных (синдром раздраженного мочевого пузыря) заболеваний мочевыводящих путей [21]. Описана также противогрибковая и антипротозойная активность экстракта золотарника обыкновенного [80]. Сухой экстракт золотарника кавказского обладает диуретической и антибактериальной активностью как в отношении грамположительных бактерий, так и грамотрицательных [35]. Также известно о гастропротекторной активности золотарника чилийского,

объясняемой наличием лабдановых дитерпенов в соцветиях этого растения [84]. В народной медицине экстракты из травы золотарника канадского используют при желчнокаменной болезни, расстройствах желудка, при ревматизме, подагре, связанных с нарушением обмена мочевой кислоты [9].

Согласно литературным данным, антибактериальным действием в отношении микроорганизмов *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Enterobacter fecalis* обладает водно-метанольный экстракт золотарника обыкновенного [54], в отношении *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* - водно-этанольный и гексановый экстракты золотарника обыкновенного, канадского и гигантского [26,37,70].

Выводы к главе 1:

1. Представители рода *Solidago* широко представлены в мировой флоре и имеют значительную сырьевую базу как на территории России, так и стран СНГ.

2. Многие виды рода *Solidago* имеют как схожий ареал обитания, так и общие морфолого-анатомические признаки. С учётом наличия обширных литературных данных действующая версия фармакопейной статьи от 1991 года «Трава золотарника канадского (*Herba Solidaginis canadensis*)» требует актуализации.

3. Химический состав и фармакологическая активность травы *Solidago canadensis* ранее изучались, однако современные физико-химические методы анализа, а также методы компьютерного прогнозирования фармакологической активности *in silico* позволяют изучить траву *Solidago canadensis* в качестве источника потенциальных лекарственных молекул.

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы исследования

Объектами исследования являлись различные образцы травы *Solidago canadensis* (рисунок 1), собранные в период с 2013 по 2019 гг. в питомнике лекарственных растений СПХФУ пос. Лемболово Всеволожского района Ленинградской области, а также один образец, собранный в окрестностях города Прага в Чехии в 2017 году (таблица 4).



Рисунок 1. Внешний вид травы *Solidago canadensis*

Трава *Solidago canadensis* заготавливалась в фазу цветения путем механического срезания верхней части побегов длиной до 100 см без грубых оснований стеблей с изменившимися окраску листьями. Собранное сырье подвергали воздушно-теновой сушке при температуре 25-30°C в хорошо проветриваемом темном помещении без доступа прямых солнечных лучей, равномерно распределяя по поверхности тонким слоем. После сушки удаляли почерневшие листья и посторонние примеси.

Для целей микроскопии из образцов травы *Solidago canadensis* были отобраны листовые пластинки, стебли и цветки. Каждая часть сырья исследовалась отдельно.

Высушенное сырье состояло из цельных облиственных ветвистых стеблей с цветками и/или незрелыми плодами, которое хранили в бумажных пакетах в сухом тёмном прохладном месте.

Воздушно-сухое сырье измельчали на электрорезке ТУ 37-53 тип 622-1-М и просеивали через сита по ОФС.1.1.0015.15 «Ситовой анализ». Для целей анализа использовали сита с отверстиями диаметром 0,5; 1; 2; 3 и 5 мм.

Таблица 4 – Сведения об исследуемых образцах сырья

Объект исследования	Место сбора	Фаза развития растения	Время сбора сырья
Трава <i>Solidago canadensis</i>	Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, пос. Лемболово	Цветение	Июль 2013
	Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, пос. Лемболово	Цветение	Июль 2016
	Чехия, окрестности г. Прага	Цветение	Август 2017
	Россия, Ленинградская обл., Всеволожский р-н, пос. Лемболово)	Цветение	Август 2018

2.2. Методы исследования

2.2.1. Методы фитохимического анализа

Для подтверждения содержания в сырье основных групп действующих веществ были использованы общепринятые методы анализа [5,11,39].

Качественный анализ флавоноидов проводился с использованием химических реакций – цианидиновой пробы, реакции со спиртовым раствором алюминия хлорида 2%, с водным раствором аммония гидроксида 10%, с спиртовым раствором железа (III) хлорида 1% и водным раствором свинца (II) ацетата 10%. Предварительно сырьё было подвергнуто экстрагированию раствором спирта этилового 70%, и для обнаружения целевой группы веществ использовалось извлечение, полученное в соотношении 1:10 (сырьё-экстрагент).

Наличие фенолкарбоновых кислот в 70% спиртовом извлечении исследовалось с помощью метода бумажной хроматографии со стандартными растворами.

Обнаружение в сырье дубильных веществ проводили в водном извлечении, полученном при нагревании на водяной бане, с помощью реакций с раствором желатина 1% в растворе натрия хлорида 10% и с раствором квасцов железоммониевых 1%.

Исследование сырья на содержание сердечных гликозидов проводилось в 70% спиртовом извлечении с помощью реакций Балье (раствор пикриновой кислоты), Розенгейма (водный раствор кислоты трихлоруксусной 90%) и Келлера-Килиани (кислота уксусная ледяная, содержащая следы железа сульфата и кислота серная концентрированная).

Для подтверждения наличия тритерпеновых сапонинов получали 70% водно-спиртовое (соотношение сырьё-экстрагент - 1:10) кипячением на водяной бане с обратным холодильником в течение 10 минут. Далее охлаждали и фильтровали через бумажный фильтр. В 2 пробирки помещали по 2 мл фильтрата. В первую пробирку прибавляли кислоту хлористоводородную 0,5 М, во вторую – натрия гидроксид 0,5 М. Пробирки встряхивали и наблюдали наличие пены. Также проводили реакцию с реактивом Санье (раствор сурьмы трёххлористой 1% с концентрированной серной кислотой, содержащей уксусный ангидрид).

Для обнаружения кумаринов использовалась лактонная проба. Предварительно получали спиртовое извлечение из сырья золотарника канадского в соотношении 1:10 путем кипячения в течение 15–20 мин на водяной бане с обратным холодильником. В качестве экстрагента использовался спирт этиловый 95%. К 2 мл полученного извлечения прибавляли 0,5 мл спиртового раствора натрия гидроксида 10% и нагревали на водяной бане. Затем добавляли 5 мл воды и 10% хлористоводородную кислоту до кислой реакции среды (по лакмусу).

Исследование травы *Solidago canadensis* на наличие производных антрацена проводилось с водно-щелочным извлечением из сырья по реакции Борнтрегера.

Полисахариды определяли в водном извлечении по реакции с раствором спирта этилового 95%.

Качественное обнаружение алкалоидов проводили с общеалкалоидными реактивами (реактивы Майера, Вагнера, Драгендорфа, раствор танина, растворы кислот пикриновой, кремневольфрамовой и фосфорномолибденовой).

Испытания на присутствие эфирного масла в воздушно-сухом сырье проводились методом перегонки с водяным паром, описанном в ОФС.1.5.3.0010.15 «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах»).

2.2.2. Экстрагирование сырья, получение фракций и подфракций

Для определения рабочей фракции, содержащей наибольшее количество целевых действующих веществ (флавоноидов), проводилась многократная экстракция 484 г измельченной и пропущенной через сито с диаметром 1 мм травы золотарника 4760 миллилитрами 80% этилового спирта [31]. Полученное извлечение упаривали в вакуумно-ротационном испарителе (Heidolph, Германия) при 60 °С до объема около 200 мл, после чего проводили многократную жидкость-жидкостную экстракцию (ЖЖ-экстракция). На

первом этапе ЖЖ-экстракция проводилась равными объемами гексана многократно до обесцвечивания органического слоя. Затем с первичным извлечением по аналогии с вышеуказанной методикой проводили ЖЖ-экстракцию равными объемами бутанола и дихлорметана. Также на наличие фенольных соединений исследовался водный остаток, полученный после выделения из первичного экстракта ЖЖ-экстракцией вторичных метаболитов гексаном, дихлорметаном и бутанолом.

2.2.3. Хроматографические методы анализа

Хроматографические методы анализа использовались для исследования и выделения фенольных соединений, в том числе флавоноидов и их гликозидов.

2.2.3.1. Бумажная хроматография

Для проведения бумажной хроматографии (БХ) использовалась хроматографическая бумага «Filtrak» (Германия) марок FN-1, FN-4, предварительно выдержанная в сушильном шкафу при температуре 100°C в течение 60 минут.

Обнаружение веществ проводилось по следующей методике: на линию старта хроматографической бумаги наносили с помощью микрокапилляра по 7-8 капель 80% водно-спиртового извлечения (1:10) из травы *Solidago canadensis* и подсушивали при комнатной температуре до удаления растворителя. Параллельно наносили эквивалентные количества растворов рабочих стандартных образцов. Хроматографические камеры для БХ предварительно насыщали парами растворителей в течение 12–16 часов. Хроматографирование осуществляли восходящим способом в герметично закрытой камере сначала в системе БУВ (4:1:2) (I направление), а затем в другой камере с системой 15% уксусная кислота (II направление). Когда фронт растворителя поднимался на уровень 85-90% от линии старта, хроматограммы извлекались, просушивались под вытяжным шкафом до полного удаления растворителей и исследовались в видимом и УФ-свете на наличие целевых компонентов напрямую или после обработки соответствующими реагентами.

2.2.3.2. Тонкослойная хроматография

Для анализа методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) использовались хроматографические пластины марок «Sorbfil» (ПТСХ–П–В–УФ) и «Sorbfil» (ТСХ-АФ-В) (Россия), предварительно выдержанные в сушильном шкафу при температуре 100°C в течение 60 минут.

На линию старта хроматографической пластинки (2 см от нижнего края) помещали в одну точку с помощью микрокапилляра по 2-3 капли водно-спиртового извлечения из травы *Solidago canadensis*. Параллельно наносили эквивалентные количества растворов стандартных образцов кемпферол-3-рутинозида, кемпферол-3-галактозида, нарциссина, рутина и изокверцитрина. Хроматографические камеры предварительно насыщали парами растворителей в течение 40 – 50 мин. Пластинку с нанесёнными пробами подсушивали на воздухе в течение 3-4 минут, помещали в камеру с системой БУВ (4:1:2) и хроматографировали восходящим методом в герметично закрытой камере [89]. Когда фронт растворителя поднимался на уровень 85-90% от линии старта, хроматограммы вытаскивали из камеры, просушивали под вытяжным шкафом при комнатной температуре до удаления следов растворителей и исследовали в видимом и УФ-свете на наличие флавоноидов и фенольных соединений напрямую или после обработки соответствующими реагентами.

2.2.3.3. Высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ)

ВЭТСХ выполнялась на приборе компании SAMAG (Швеция). Нанесение образцов фракций производилось с помощью полуавтоматического аппликатора Linomat 5 (Швеция). Исследуемые образцы наносились по 5 мкл (1-4 трэки) и 10 мкл (5-8 трэки), по порядку с 1 по 4 фракции на пластины MERCK NP TLC silica gel 60 F₂₅₄, 20 x 10 см (Германия). Далее пластины помещались в автоматическую камеру SAMAG Automatic Developing Chamber (ADC2) (Швеция) с системой БУВ (4:1:2). Производилась предварительная сушка пластины в течение 30 секунд. Насыщение камеры происходило в течение 30 минут, далее предкондиционирование пластины в течение 5 минут.

Элюирование продолжалось до тех пор, пока фронт растворителя не достигал 85 мм от линии старта. Сушка пластины после хроматографического процесса осуществлялась в течение 5 мин при комнатной температуре. Изображения были получены с помощью визуализера CAMAG TLC Visualizer 2 (Швеция) в видимом свете и двух длинах волн – 254 и 366 нм. УФ – спектрометрию пятен проведена на спектроденситометре CAMAG Scanner 3 (Швеция).

2.2.3.4. Аналитическая высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Для выбора рабочей фракции проводился анализ полученных подфракций (гексановая, дихлорметановая бутанольная и водная) методом аналитической ВЭЖХ. В 4 пронумерованные виалы (№ 1,2,3,4) вместимостью 1,5 мл каждая, предварительно помещалось по 0,25 мл этилового спирта 96%, затем по 0,25 мл каждой из подфракций в соответствии с номером виалы. Анализ проводился на аналитическом ВЭЖХ LC-20 Prominence, компании Shimadzu (Япония), оснащенном диодно-матричным детектором при длинах волн 235, 254, 280, 340 нм с хроматографической колонкой «SUPELCOSIL» LC-18, 25см x 4.6 мм, 5 мкм. Температура анализа - 40°C. Элюент: вода (компонент А), ацетонитрил (компонент В) с содержанием ТФУ 0,1% [31].

2.2.3.5. Препаративная высокоэффективная жидкостная хроматография

Препаративная ВЭЖХ осуществлялась с использованием системы «Smartline», включающей в себя препаративный хроматограф Knauer (Германия), снабженный колонкой для обращенно-фазовой ВЭЖХ «Kromasil C18» (250 x 30 мм, 5 мкм) (Швеция), насосом Knauer preparative pump 1800 (Германия), ультрафиолетовым детектором Knauer UV-detector 2520 (Германия). Ввод проб осуществляли вручную с использованием плунжерного шприца вместимостью 2 мл (Hamilton, США). Объем вводимой пробы 0,2-0,5 мл. Подвижная фаза: ТФУ 0,1% в ультрачистой воде (компонент А); ТФУ 0,1% в ацетонитриле класса "для ВЭЖХ" (компонент В). Длительность процесса - 65 минут; скорость потока - 1 мл/мин. Сбор фракций проводился вручную [13].

2.2.4. Масс-спектрометрия высокого разрешения

Для проведения масс-спектрометрического исследования 1 мг выделенного методом препаративной хроматографии и лиофилизированного вещества растворяли в 1 мл метанола и фильтровали через шприцевой фильтр с диаметром пор 0,2 мкм. Анализ производили с использованием Bruker Micromass Q-TOF (Германия). Расшифровку структур выделенных соединений проводили вручную с использованием программного обеспечения mMass.

2.2.5. ЯМР- спектроскопия

Спектры выделенных вторичных метаболитов были записаны на приборе Bruker Avance III 400 MHz ЯМР-спектрометре (США). Запись спектра производили при 25°C с использованием дейтерированного диметилсульфоксида в качестве растворителя при частоте 400 МГц. Расшифровку полученных спектров проводили с использованием программного обеспечения MestReNova 14.1.2.

2.2.6. Методы товароведческого анализа

При проведении товароведческого анализа были определены показатели качества сырья согласно методикам общих фармакопейных статей Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) XIV издания: «Определение влажности лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» (ОФС.1.5.3.0007.15), «Зола общая» (ОФС.1.2.2.2.0013.15), «Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте» (ОФС.1.5.3.0005.15), «Определение подлинности, измельчённости и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ОФС.1.5.3.0004.15). Анализ по каждому показателю проводился трёхкратно для каждого образца сырья.

2.2.7. Методы макро– и микроскопического анализа

Морфолого-анатомическое изучение сырья осуществлялось на образцах надземной части золотарника канадского, собранных в августе 2018 года на территории питомника лекарственных растений СПХФУ в фазу цветения. Все

образцы были собраны по единой технологии и в одинаковых условиях, в соответствии с правилами заготовки ЛРС. Внешний вид травы изучался визуально и с помощью бинокулярной лупы. Макроскопический анализ сырья проводился в соответствии с требованиями ОФС.1.5.1.0002.15 «Травы».

При определении внешних признаков траву *Solidago canadensis* рассматривали визуально и с помощью бинокулярной лупы ($\times 10$). Особое внимание уделялось строению стеблей, листьев, цветков и плодов. Цвет был определён у сухого сырья при дневном освещении, запах - при растирании, вкус – при пробе кусочка сухого сырья.

Для микроскопического исследования травы *Solidago canadensis* отбирались цельные листья, стебли и корзинки с цветками. Временные препараты органов растений (стебель, лист, цветок) готовили в соответствии с требованиями общей фармакопейной статьи (ОФС) 1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания. Препараты, просветлённые в 5% растворе щелочи, исследовали с поверхности. Поверхность листьев изучали с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ). Для этого объекты фиксировали 3% раствором глутарового альдегида, обезвоживали в серии спиртов и проводили через смесь спирта и изоамилацетата, а также чистый изоамилацетат, затем высушивали при критической точке жидкой углекислоты. Высушенные объекты наклеивали на столики, напыляли золотом и исследовали с помощью микроскопа JSM 6390 (Jeol).

Анатомическое строение листа, стебля и цветков золотарника канадского изучали на продольных и поперечных срезах. Для этого образцы фиксировали 3% раствором глутарового альдегида, разведённого фосфатным буфером с рН 7.4, постфиксировали 2% раствором тетраоксида осмия в течение 24 часов. Материал обезвоживали в серии растворов ацетона возрастающих концентраций (от 30 до 100%), затем заключали в смесь эпона и аралдита. Полутонкие срезы (2 и 4 мкм) получали с помощью

ультрамикротоме Ultracut E (Reichert-Jung). Резку проводили алмазным ножом. Препараты окрашивали 1% раствором толуидинового синего в растворе тетрабората натрия и исследовали с помощью лабораторного светового микроскопа «ZEISS Axioscope Lab.A1 (Zeiss), оснащенного цифровой видеокамерой «AxioCam MC-HD2» и объективами *5, *10, *20, *40, а также просвечивающего электронного микроскопа «ZEISS Libra 120» с программным обеспечением Zen 2011.

Фотографии были обработаны на компьютере с помощью программы «Helicon Focus 6.7.1» [28].

2.2.8. Количественное определение флавоноидов в сырье

За основу методики количественного определения флавоноидов в траве *Solidago canadensis* избран метод дифференциальной спектрофотометрии по реакции комплексообразования флавоноидов с алюминия хлоридом (III), сопровождающейся батохромным сдвигом длинноволновой полосы поглощения в УФ-спектре [32].

В качестве стандарта предлагается раствор стандартного образца (СО) рутина в спирте этиловом 80%.

Методика количественного определения: часть аналитической пробы сырья измельчается до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещается в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, добавляется 100 мл спирта этилового 80%. Далее колба вместе с содержимым взвешивается с точностью до 0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 90 минут, изредка помешивая. Затем колба охлаждается в течение 20 минут при комнатной температуре, после чего остывшую колбу взвешивают и доводят спиртом этиловым 80% до первоначальной массы. Извлечение фильтруется через бумажный фильтр в колбу вместимостью 100 мл.

В две мерные колбы вместимостью 25 мл помещают по 1 мл извлечения, в одну из колб добавляют 4 мл раствора алюминия хлористого 2% в спирте

этиловом 95% (раствор А), раствор в обеих колбах подкисляют 1 каплей разведенной кислоты уксусной и доводят объем раствора обеих колб спиртом этиловым 80% до метки. Через 35 минут измеряют оптическую плотность раствора А относительно раствора сравнения на спектрофотометре при длине волны $\lambda=409$ нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

Параллельно готовят раствор СО рутина следующим образом.

Около 0,013 г (точная навеска) СО рутина, предварительно высушенного до постоянной массы при температуре 100-105°C, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в небольшом объеме спирта этилового 80% на горячей водяной бане и доводят объем раствора тем же растворителем до метки.

В мерную колбу объемом 25 мл, помещают 1 мл раствора СО рутина, добавляют 2 мл раствора алюминия хлористого 2% в спирте этиловом 95%, подкисляют 1 каплей разведенной кислотой уксусной и доводят объем раствора спиртом этиловым 80% до метки. Через 35 минут измеряют оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны $\lambda=409$ нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используется раствор СО рутина.

Приготовление раствора алюминия хлорида 2%: 2 г алюминия хлорида растворяют в спирте этиловом 95%, доводят тем же растворителем до метки. Срок годности раствора - 1 месяц.

Суммарное содержание флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) определялось по формуле:

$$X = \frac{D_a \times M \times 100 \times 25 \times 100 \times 100}{D_o \times M_o \times 25 \times 25 \times (100 - W)} = \frac{D_a \times M \times 4 \times 100 \times 100}{D_o \times M_o \times (100 - W)}, \text{ где}$$

D_a — оптическая плотность испытуемого раствора;

D_o — оптическая плотность раствора СО рутина;

M — масса сырья в граммах;

M_o — масса СО рутина в граммах;

W — потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве *Solidago canadensis* проводилась по показателям специфичности, линейности, правильности, повторяемости и робастности.

Глава 3. ТОВАРОВЕДЧЕСКИЙ И ОБЩИЙ ФИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ТРАВЫ *SOLIDAGO CANADENSIS*

3.1. Определение товароведческих показателей травы *Solidago canadensis*

Одним из этапов разработки нормативной документации на растительное сырье является проведение товароведческого анализа и разработка показателей качества ЛРС [30].

Для каждого измельчённого образца травы *Solidago canadensis* были определены показатели подлинности (морфологические и анатомические признаки сырья, качественные реакции на основные группы биологически активных соединений) и показатели качества (содержание суммы флавоноидов, влажность, содержание золы общей и нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной). Для цельных образцов сырья были определены пределы измельченности сырья, содержание стеблей, в том числе отделенных при анализе, содержание частиц сырья, изменивших окраску, а также содержание минеральной и органической примесей. Данные по товароведческому анализу травы *Solidago canadensis* представлены в таблице 5.

Таблица 5. Товароведческие показатели образцов надземной части *Solidago canadensis*

№ образца Показатель	I	II	III	IV
Сумма флавоноидов в пересчёте на рутин, % (для измельчённого сырья)	7,58±0,38	7,85±0,39	6,67±0,33	7,33±0,36

Влажность, % (для измельчённого сырья)	6,37±0,33	6,73±0,37	6,28±0,30	7,1±0,31
Зола общая, % (для измельчённого сырья)	7,25±0,20	6,84±0,22	6,92±0,21	6,8±0,23
Зола, нерастворимая в 10% растворе кислоты хлористоводородной, % (для измельчённого сырья)	0,28±0,02	0,24±0,02	0,27±0,02	0,3±0,02
Стеблей, в том числе отделённых при анализе, % (для цельного сырья)	13,13±0,54	11,11±0,51	10,44±0,46	12,04±0,50
Частей сырья, изменивших окраску и повреждённых вредителями, % (для цельного сырья)	0,8±0,12	0,73±0,09	0,79±0,08	0,56±0,07
Частиц сырья, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 5 мм, % (для измельчённого сырья)	5,7±0,38	5,13±0,33	4,9±0,38	6,4±0,40
Частиц сырья, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм, % (для цельного сырья)	3,07±0,31	2,21±0,24	2,34±0,22	3,26±0,31

Органической примеси, % (для цельного сырья)	2,0±0,19	1,73±0,17	2,2±0,23	1,94±0,20
Минеральной примеси, % (для цельного сырья)	0,6±0,06	0,47±0,04	0,51±0,05	0,44±0,04

Примечание: I – трава *Solidago canadensis* (питомник СПХФУ, июль 2013), II – трава *Solidago canadensis* (питомник СПХФУ, июль 2016), III – трава *Solidago canadensis* (Чехия, окр. Праги, август 2017), IV – трава *Solidago canadensis* (питомник СПХФУ, август 2018).

Полученные данные согласуются с ФС 42-2777-91 «Трава золотарника канадского», согласно которой числовые показатели сырья определены в следующих пределах: суммы флавоноидов в пересчёте на рутин не менее 3,0%; влажность не более 12,0%; золы общей не более 11,0%; стеблей не более 15,0%; пожелтевших и побуревших листьев не более 10,0%; органической примеси не более 3,0%; минеральной примеси не более 1,5% [33].

3.2. Общий фитохимический анализ травы *Solidago canadensis* на основные группы биологически активных веществ

Общий фитохимический анализ проводился для всех собранных образцов травы *Solidago canadensis*. Из образцов сырья получали водные и спиртовые извлечения, которые подвергали предварительным испытаниям на основные группы биологически активных веществ (флавоноиды, фенольные кислоты, дубильные вещества, кардиотонические гликозиды, тритерпеновые сапонины, кумарины, антраценпроизводные, полисахариды, эфирные масла, алкалоиды).

1) Для обнаружения флавоноидов предварительно было получено 70% спиртовое извлечение из травы *Solidago canadensis*. Во всех случаях качественные реакции (проба Шинода, водный раствор свинца (II) ацетата 10% и др.) были положительными, что указывает на наличие флавоноидов в испытуемых образцах сырья.

2) Наличие фенолкарбоновых кислот в 70% спиртовом экстракте подтверждалось с помощью метода бумажной хроматографии со стандартными растворами. При этом отмечались пятна с голубой, синей и фиолетовой флуоресценцией, свидетельствующие о присутствии фенолкарбоновых кислот в исследуемых образцах.

3) Проведенные реакции на дубильные вещества (с раствором желатина 1% в растворе натрия хлорида 10%) дали положительный результат, что указывает на наличие данной группы веществ. Реакцией Стиасни (с 40%-ным раствором формальдегида и кислотой хлористоводородной концентрированной) было установлено наличие гидролизуемых и конденсированных дубильных веществ. Преобладающей группой являются гидролизуемые таниды.

4) Проведенные с 70% спиртовым извлечением из сырья реакции на наличие кардиотонических гликозидов (реакции Балье, Розенгейма, Келлера-Килиани) показали отрицательный результат.

5) Испытания на наличие в сырье сапонинов с помощью реакции пенообразования в кислой и щелочной среде показали, что данная группа содержится в сырье *Solidago canadensis*. При этом большее количество пены образовывалось в пробирке с кислотой хлористоводородной. Реакция Санье дала отрицательный результат, что свидетельствует о наличии в сырье сапонинов именно тритерпенового ряда.

6) Эффект лактонной пробы для обнаружения кумаринов был незначительным для всех образцов (при нагревании навески сырья на водяной бане с обратным холодильником наблюдалось жёлтое окрашивание; добавление к реакционной смеси кислоты хлористоводородной 10% дало незначительное помутнение раствора, что свидетельствует о следовых количествах кумаринов в сырье).

7) Реакция Борнтрегера не дала положительного эффекта, что свидетельствует об отсутствии группы антраценпроизводных.

8) Испытанию на содержание полисахаридов подвергали водные извлечения из надземной части растений. Появление хлопьевидного осадка после прибавления в пробирку по каплям спирта этилового 95% позволяет предположить наличие водорастворимых полисахаридов.

9) Для обнаружения алкалоидов в сырье проводили экстракцию органическим растворителем, несмешивающимся с водой (дихлорметаном) при подщелачивании его 5% раствором аммиака. Полученный экстракт обрабатывали водным раствором 5% уксусной кислоты. Органический слой отбрасывали, а в водном растворе определяли наличие алкалоидов с применением общеалкалоидных реактивов (реактивы Бушарда, Драгендорфа, пикриновая кислота). Отсутствие выраженных осадков с общеалкалоидными реактивами позволяет сделать вывод об отсутствии алкалоидов в анализируемых образцах.

10) Во всех образцах травы *Solidago canadensis* по методу 1, приведённому в ГФ 14 [5] было обнаружено малое количество эфирного масла (менее 0,1%).

Данные по общему фитохимическому анализу представлены в таблице 6.

Таблица 6. Результаты общего фитохимического анализа травы *Solidago canadensis* на основные группы биологически активных веществ

Образец сырья Группа БАВ	I	II	III	IV
Флавоноиды	+	+	+	+
Фенолкарбоновые кислоты	+	+	+	+
Дубильные вещества	+	+	+	+
Сапонины	+	+	+	+
Полисахариды	+	+	+	+
Эфирные масла	±	±	±	±
Кумарины	±	±	±	±

Алкалоиды	-	-	-	-
Антраценпроизводные	-	-	-	-
Сердечные гликозиды	-	-	-	-

Примечание: обозначения образцов сырья указаны в примечании к таблице 5

+ группа веществ присутствует;

- группа веществ отсутствует;

± группа веществ присутствует в незначительных количествах.

Выводы к главе 3:

1. В результате проведенного товароведческого анализа различных образцов травы *Solidago canadensis* определены показатели подлинности и доброкачественности. Полученные данные согласуются с ФС 42-2777-91 «Трава золотарника канадского (*Herba Solidaginis canadensis*)».

2. По результатам проведенных общих фитохимических испытаний образцов сырья *Solidago canadensis* на содержание основных групп биологически активных веществ были обнаружены флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, дубильные вещества, сапонины, полисахариды, а также незначительное количество кумаринов и эфирного масла. Изученные образцы не содержали сердечных гликозидов, производных антрацена и алкалоидов.

3. Оценка результатов проведенных испытаний показывает, что количественное содержание флавоноидов в образцах сырья, собранных в питомнике СПХФУ (Ленинградская обл.) выше, чем в аналогичных образцах, собранных в окрестностях Праги (Чехия), примерно на 0,5%.

Глава 4. ИССЛЕДОВАНИЕ КОМПОНЕНТНОГО СОСТАВА ТРАВЫ *SOLIDAGO CANADENSIS* ХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМИ МЕТОДАМИ

Для исследования компонентного состава флавоноидов в 80% спиртовом извлечении из травы *Solidago canadensis* использовались хроматографические методы.

4.1. Бумажная хроматография

При просмотре хроматограмм исследуемых извлечений в УФ-свете наблюдали зоны адсорбции темной или слабо темной окраски, которые после обработки спиртовым раствором оксид-дихлорид циркония 2% приобретали желтую или зеленовато-желтую окраску (рисунок 2).

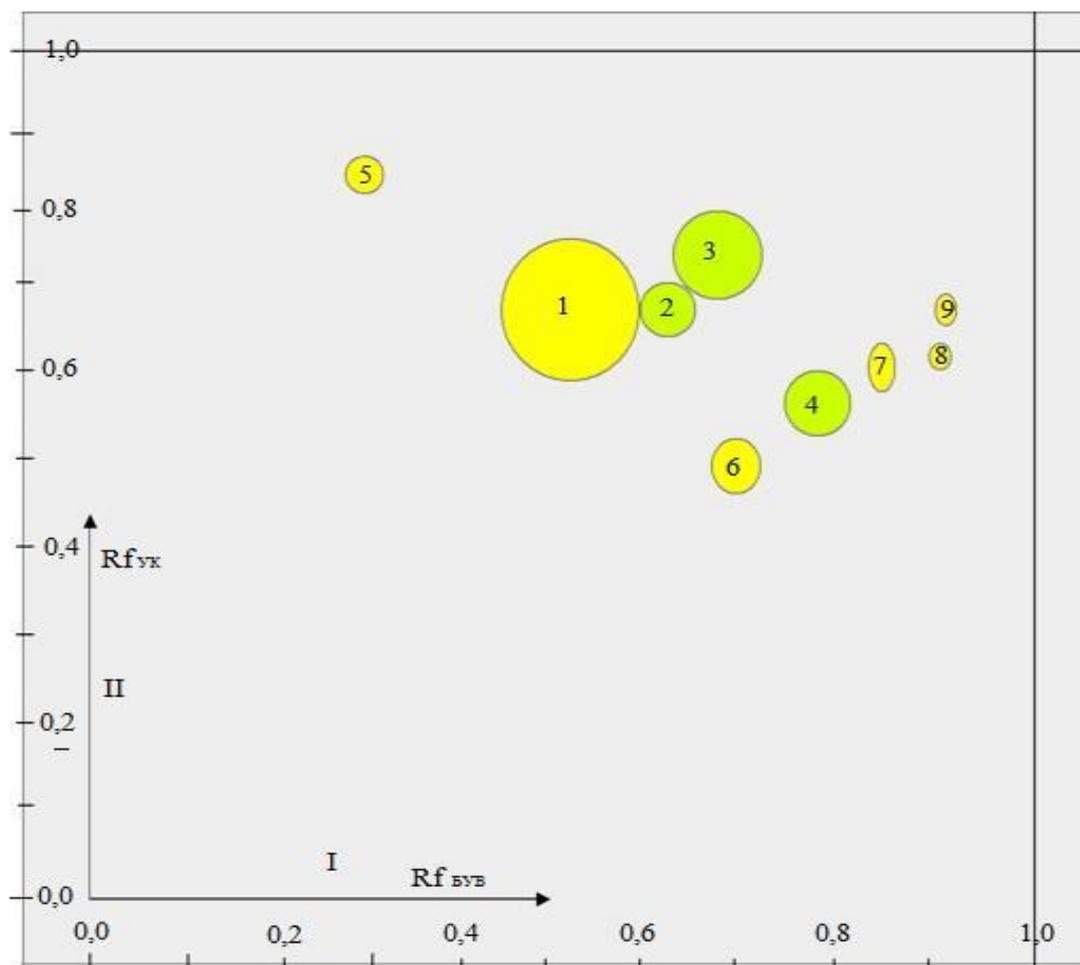


Рисунок 2. Бумажная двумерная хроматограмма 80% спиртового извлечения золотарника канадского в системе БУВ (4:1:2) (I направление) и 15% уксусная кислота (II направление).

Примечание: цифрами даны условные обозначения пятен.

Для идентификации веществ на хроматограммах проводили анализ значений R_f и окраски пятен до и после проявления специфическими реактивами в сравнении со стандартными образцами (растворы-свидетели). Свидетели были подобраны с учетом литературных данных по флавоноидному составу травы *Solidago canadensis* [3,35,47]. Сумму спиртовых растворов стандартных образцов наносили на отдельную хроматограмму и проводили их разделение параллельно со спиртовым извлечением из травы *Solidago canadensis* в тех же системах растворителей. Кроме того, свидетели наносили на хроматограммы вместе со спиртовым извлечением из сырья. После просмотра хроматограмм в УФ-свете и проявления их реактивами (2% спиртовой раствор оксид-дихлорид циркония, пары аммиака) устанавливали подлинность флавоноидов по совпадению значений R_f и окраски пятен (таблица 7).

Таблица 7. Результаты бумажно-хроматографического изучения флавоноидов

№	Значение R_f пятен		Окраска пятен флавоноидов			Вещество
	БУВ (4:1:2)	15% УК	До обработки раствором оксид- дихлорид циркония	После обработки раствором оксид- дихлорид циркония	После обработки парами аммиака	
1	0,58	0,64	Интенсивно -тёмное	Жёлтое	Оранжево- жёлтое	Рутин
2	0,63	0,64	Тёмное	Зелёно- жёлтое	Яркое зелёно- жёлтое	Нарциссин
3	0,67	0,69	Интенсивно -тёмное	Зелёно- жёлтое	Яркое зелёно- жёлтое	Кемпферол-3- рутинозид
4	0,78	0,55	Интенсивно -тёмное	Зелёно- жёлтое	Яркое зелёно- жёлтое	Не идентифицировано

5	0,29	0,84	Тёмное	Жёлтое	Жёлтое	Не идентифицировано
6	0,7	0,47	Тёмное	Жёлтое	Жёлтое	Изокверцитрин
7	0,82	0,56	Тёмное	Жёлтое	Оранжево- жёлтое	Не идентифицировано
8	0,91	0,63	Тёмное	Жёлтое	Оранжево- жёлтое	Не идентифицировано
9	0,89	0,59	Тёмное	Жёлтое	Оранжево- жёлтое	Не идентифицировано

На основании данных бумажной хроматографии в траве *Solidago canadensis* было установлено присутствие не менее 9 флавоноидных соединений, из которых было подтверждено наличие следующих компонентов: рутин, изокверцитрин, нарциссин и кемпферол-3-рутинозид.

4.2. Тонкослойная хроматография

На хроматограмме испытуемого раствора в УФ-свете наблюдали зоны адсорбции темного цвета с соответствующими значениями R_f . Затем пластинку обрабатывали 2% спиртовым раствором оксид-дихлорид циркония, выдерживали в вытяжном шкафу при комнатной температуре до полного удаления растворителя. На хроматограмме испытуемого раствора наблюдали зоны адсорбции желтого или зеленовато-желтого цвета (рисунок 3). Данные хроматографического анализа травы *Solidago canadensis* представлены в таблице 8.

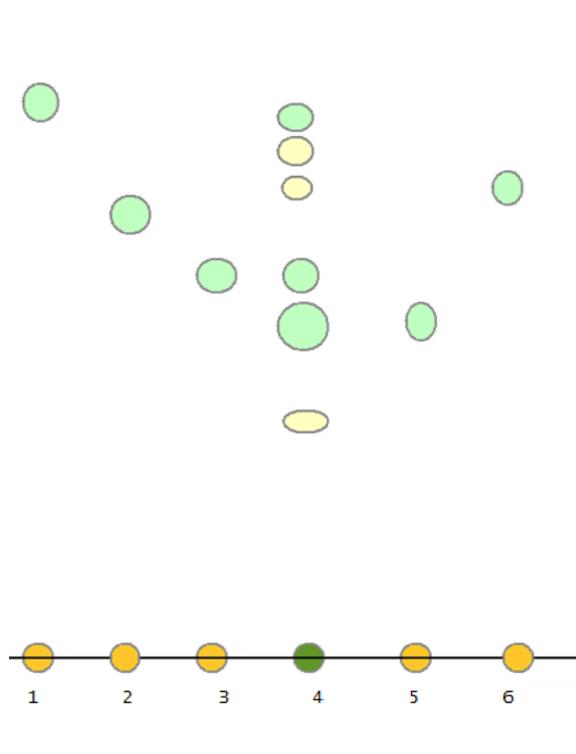


Рисунок 3. ТСХ спиртового извлечения травы *Solidago canadensis* и растворов стандартных образцов флавоноидов в системе БУВ (4:1:2).

Условные обозначения: 1- кемпферол-3-галактозид; 2- кемпферол-3-рутинозид; 3- нарциссин; 4- 80% спиртовое извлечение травы *Solidago canadensis* (Лемболово); 5- рутин; 6-изокверцитрин

Таблица 8. Результаты тонкослойной хроматографии спиртового извлечения надземной части *Solidago canadensis*

№	Значение R_f пятен флавоноидов	Окраска пятен флавоноидов		Вещество
		До обработки реактивом	После обработки реактивом	
1	0,85	Тёмное	Жёлтое	Кемпферол-3-галактозид
2	0,68	Тёмное	Жёлтое	Кемпферол-3-рутинозид
3	0,57	Тёмное	Жёлтое	Нарциссин

4	1) 0,36	Слабо-тёмное	Светло-жёлтое	Сумма неидентифицированных веществ 80% спиртового извлечения
	2) 0,51	Тёмное	Интенсивно- жёлтое	
	3) 0,58	Слабо-тёмное	Светло-жёлтое	
	4) 0,71	Слабо-тёмное	Светло-жёлтое	
	5) 0,78	Тёмное	Жёлтое	
	6) 0,84	Тёмное	Жёлтое	
5	0,51	Тёмное	Жёлтое	Рутин
6	0,71	Тёмное	Жёлтое	Изокверцитрин

При проведении тонкослойной хроматографии 80% спиртового извлечения и последующем проявлении хроматограммы спиртовым раствором оксид-дихлорид циркония 2% обнаружено 6 пятен с характерной окраской для флавоноидов, пять из которых по значениям R_f совпали с образцами свидетелей - рутином, изокверцитрином, нарциссином, кемпферол-3-рутинозидом и кемпферол-3-галактозидом. Данный результат позволяет предположить наличие этих соединений в траве *Solidago canadensis*

Таким образом, на основании данных тонкослойной и бумажной хроматографии в образце сырья *Solidago canadensis* было установлено наличие не менее 9 флавоноидных соединений, из которых было подтверждено присутствие рутина, изокверцитрина, нарциссина и кемпферол-3-рутинозида.

4.3. Высокоэффективная тонкослойная хроматография

Методом ВЭТСХ был проанализирован компонентный состав соединений, содержащихся в 4 фракциях, выделенных из сырья золотарника канадского. Для поиска наиболее перспективных фракций, которые в дальнейшем использовались бы для выделения индивидуальных веществ, были сняты ВЭТСХ-УФ хроматограммы. УФ-спектры всех значимых вторичных метаболитов были зарегистрированы отдельно для н-гексановой, дихлорметановой, н-бутанольной и водной фракции.

На линию старта ВЭТСХ пластинки аппликатором поочередно слева направо наносилось по 5 мкл гексановой, дихлорметановой, бутанольной и водной фракции (дорожки 1-4). Затем на эту же пластинку справа в том же порядке наносилось по 10 мкл каждой из этих фракций (дорожки 5-8).

Хроматограммы были получены в видимом свете (рисунок 4) и УФ-свете при длинах волн 254 нм (рисунок 5) и 366 нм (рисунок 6).

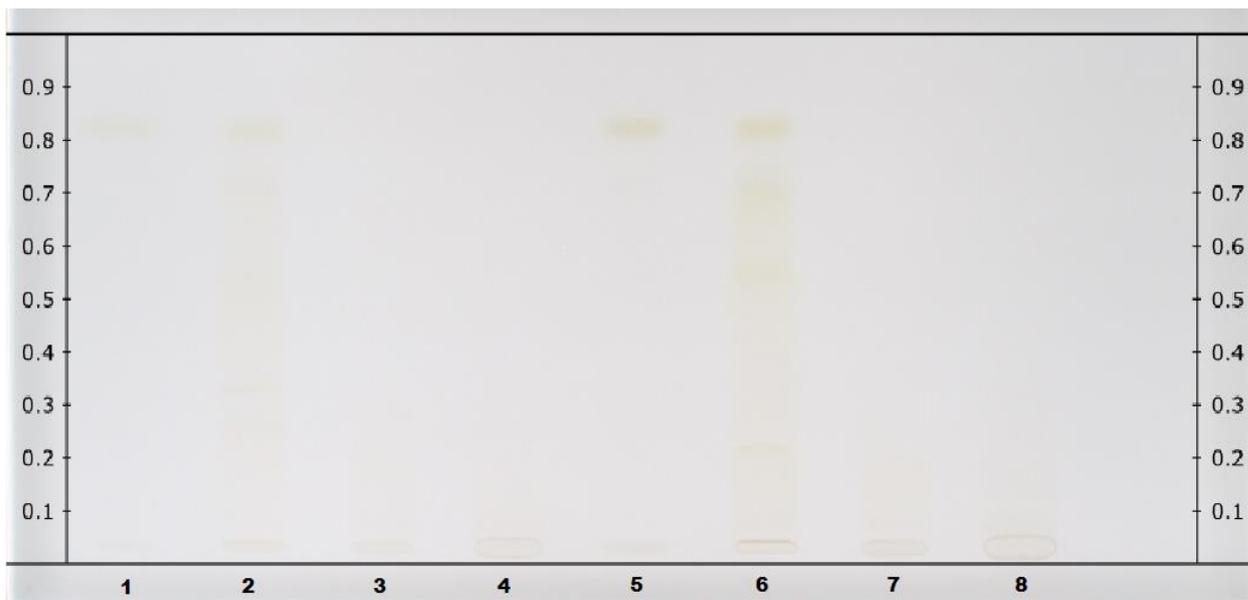


Рисунок 4. Хроматограмма ВЭТСХ в видимой области

Условные обозначения: 1,5 – гексановая фракция; 2,6 – дихлорметановая фракция; 3,7 – бутанольная фракция; 4,8 – водная фракция. Объёмы наносимых фракций: 5 мкл (1-4 дорожки) и 10 мкл (5-8 дорожки).

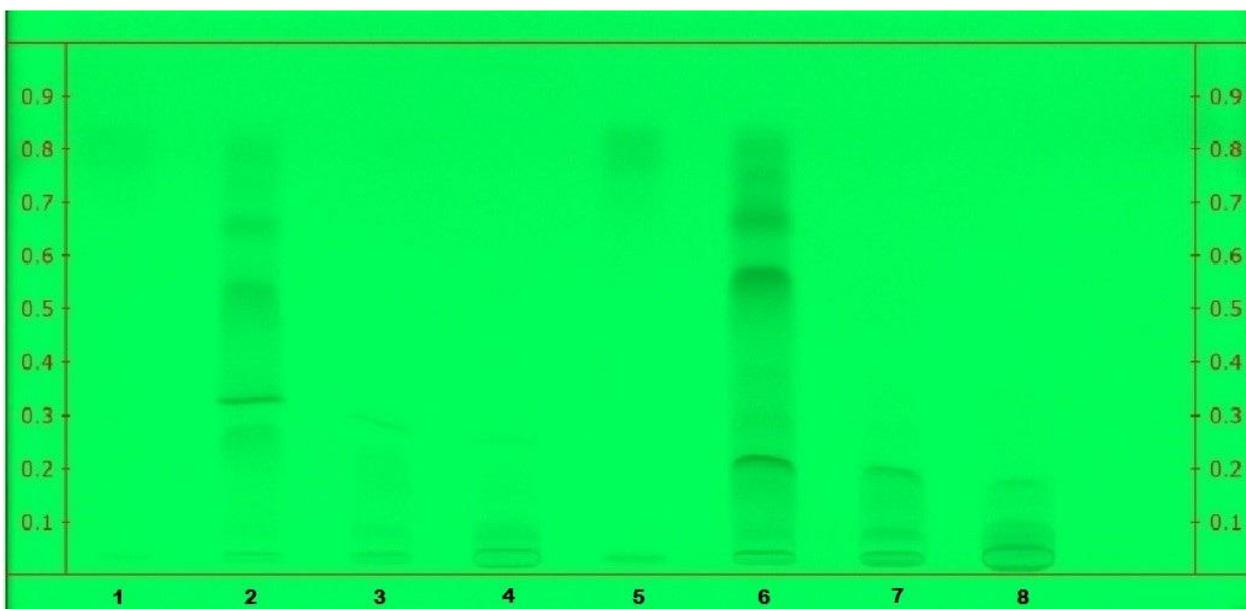


Рисунок 5. Хроматограмма ВЭТСХ при длине волны $\lambda=254$ нм

Условные обозначения: см. рис.4.

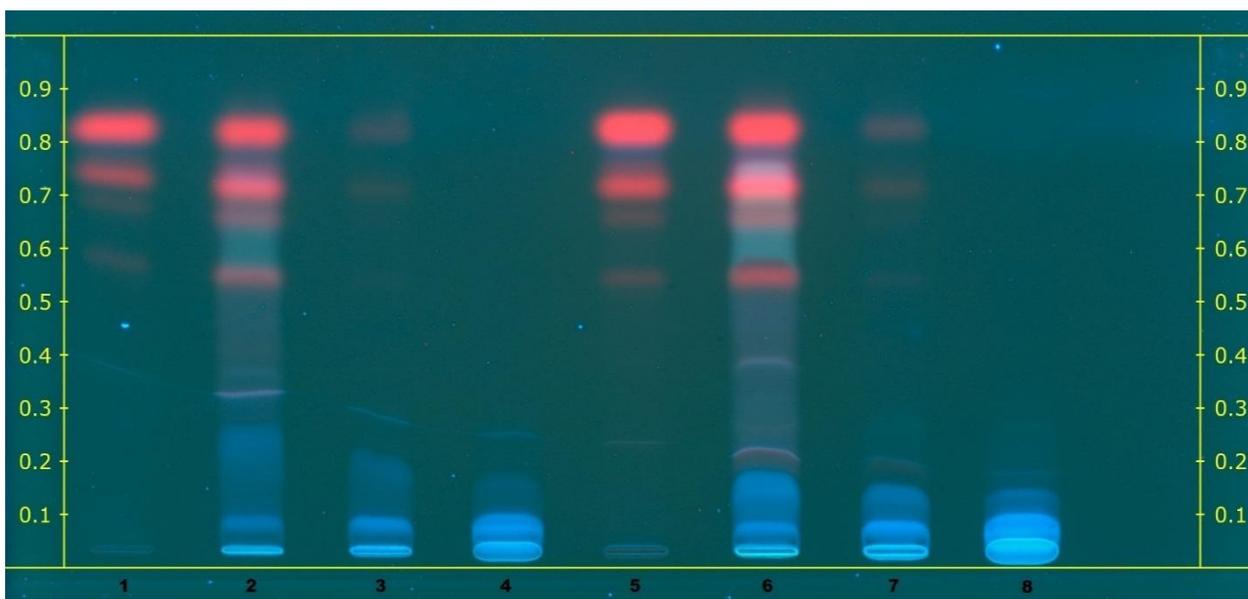


Рисунок 6. Хроматограмма ВЭТСХ при длине волны $\lambda=366$ нм

Условные обозначения: см. рис.4.

На рисунке 6 заметно, что в гексановой фракции наибольшей флуоресценцией при длине волны 366 нм обладают пятна липофильной природы с высокими значениями R_f , соответствующие пятнам хлорофилла. Наряду с другими, те же пятна наблюдались в дихлорметановой фракции. Несмотря на богатый состав различных по природе веществ выделение

целевых компонентов из дихлорметановой фракции было затруднено из-за содержания хлорофилла. В бутанольной и водной фракциях в диапазоне R_f 0-0,2 было заметно значительное совпадение качественного состава соединений.

В результате анализа фракций методом ВЭТСХ было выявлено, что наиболее перспективными для дальнейшего изучения фенольных соединений являются бутанольная и водная фракции, полученные методом жидкость-жидкостной экстракции из этанольного экстракта травы *Solidago canadensis*, поскольку содержащиеся в них вещества имеют наибольшее сродство к фенольным соединениям. Кроме того, в них отмечено наименьшее содержание хлорофиллов и прочих балластных липофильных веществ в сравнении с гексановой и дихлорметановой фракциями.

4.4. Аналитическая высокоэффективная жидкостная хроматография

Для проведения детального анализа компонентного состава основных вторичных метаболитов, содержащихся в траве *Solidago canadensis* и определения фракций для выделения индивидуальных соединений были сняты ВЭЖХ-УФ хроматограммы. УФ-спектры всех значимых вторичных метаболитов были зарегистрированы для соединений, содержащихся в гексановой, дихлорметановой, бутанольной фракциях и водно-спиртовом остатке.

Хроматографические условия ВЭЖХ-анализа фракций и подфракций представлены в разделе 2.2.2.3.

При исследовании 4 вышеуказанных фракций методом аналитической ВЭЖХ был получен ряд хроматограмм с пиками, позволяющими сделать предположение о природе и структуре содержащихся во фракциях веществ. Анализ хроматограмм проводился на основании литературных данных о соединениях, ранее выделенных из соответствующих фракций *Solidago canadensis* [10,16,46,47,58,74,78,82,88] и на основании базы данных

природных соединений Dictionary of Natural Products [53]. Условия проведения аналитической ВЭЖХ представлены в таблице 9.

Таблица 9. Условия аналитической ВЭЖХ

Время (мин)	Скорость потока элюента (мл/мин)	Содержание компонента А (вода), % от общей массы элюента	Содержание компонента В (ТФУ), % от общей массы элюента
0,01	1,00	95	5
5,00	1,00	95	5
45,75	1,00	0	100
50,00	1,00	0	100
60,00	1,00	95	5
65,00	1,00	95	5

Гексановая фракция. В данной фракции содержалось незначительное количество соединений с низкой интенсивностью (рисунок 7). Поэтому гексановая фракция дальнейшему анализу не подвергалась. Тем не менее, жидкость-жидкостная экстракция с использованием гексана использовалась в качестве промежуточного этапа для получения остальных фракций, так как в гексановую фракцию переходили липофильные балластные вещества. Устранение липофильных балластных веществ на ранних этапах жидкость-жидкостной экстракции позволяет уменьшать загрязнение сорбентов и оборудования, что существенно сокращает экономические затраты и играет важную роль в выделении индивидуальных веществ.



Рисунок 7. ВЭЖХ-УФ хроматограмма гексановой фракции травы *Solidago canadensis* при длине волны 254 нм

Дихлорметановая фракция. В дихлорметановой фракции также отмечено содержание незначительного количества соединений (рисунок 8), часть из которых предположительно относится к фенолкарбоновым кислотам, флавонолам и их 3-О-гликозидам (таблица 10). Как и гексановая, дихлорметановая фракция не рассматривалась в качестве целевой для выделения индивидуальных субстанций ввиду частичного перекрытия хроматографических пиков с соединениями бутанольной и водной фракций, а также остаточного количества балластных веществ липофильной природы, не перешедших в гексановую фракцию и затрудняющих выделение вторичных метаболитов в качестве индивидуальных соединений.

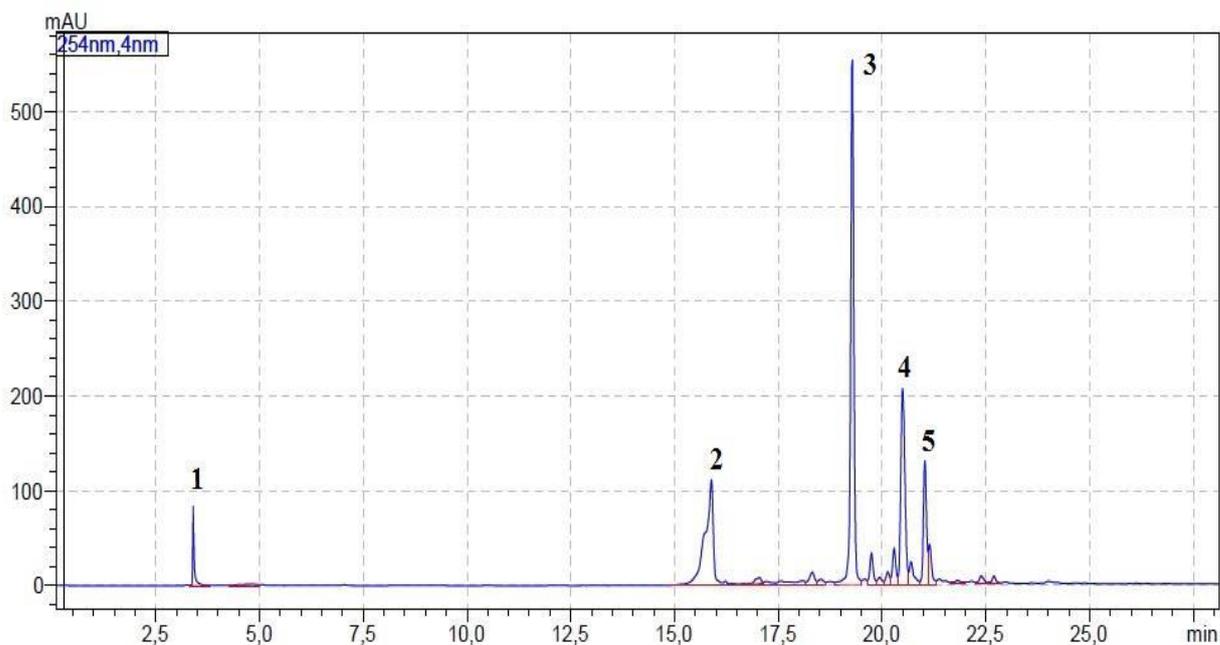


Рисунок 8. ВЭЖХ-УФ хроматограмма дихлорметановой фракции травы *Solidago canadensis* при длине волны 254 нм

Таблица 10. Интерпретация пиков хроматограммы дихлорметановой фракции

№ пика	Время удерживания мин	Максимумы поглощения, нм	Класс предполагаемого метаболита
1	3,403	221	Фенолкарбоновые кислоты
2	15,888	326	Фенолкарбоновые кислоты
3	19,281	252; 351	Флавонол-3-О-гликозид
4	20,493	234; 327	Флавонол-3-О-гликозид
5	21,030	254; 354	Флавонол-3-О-гликозид

Бутанольная фракция. По результатам исследования бутанольной фракции отмечено содержание в ней 7 мажорных вторичных метаболитов (рисунок 9), из которых предположительно 6 относятся к флавонолам и их 3-О-гликозидам, а 1 – к фенолкарбоновым кислотам (таблица 11). Больше число предполагаемых соединений, высокая интенсивность хроматографических

пиков, относительная чистота фракции от балластных и липофильных веществ позволяют рассматривать её в качестве целевой для выделения вторичных метаболитов в чистом виде.

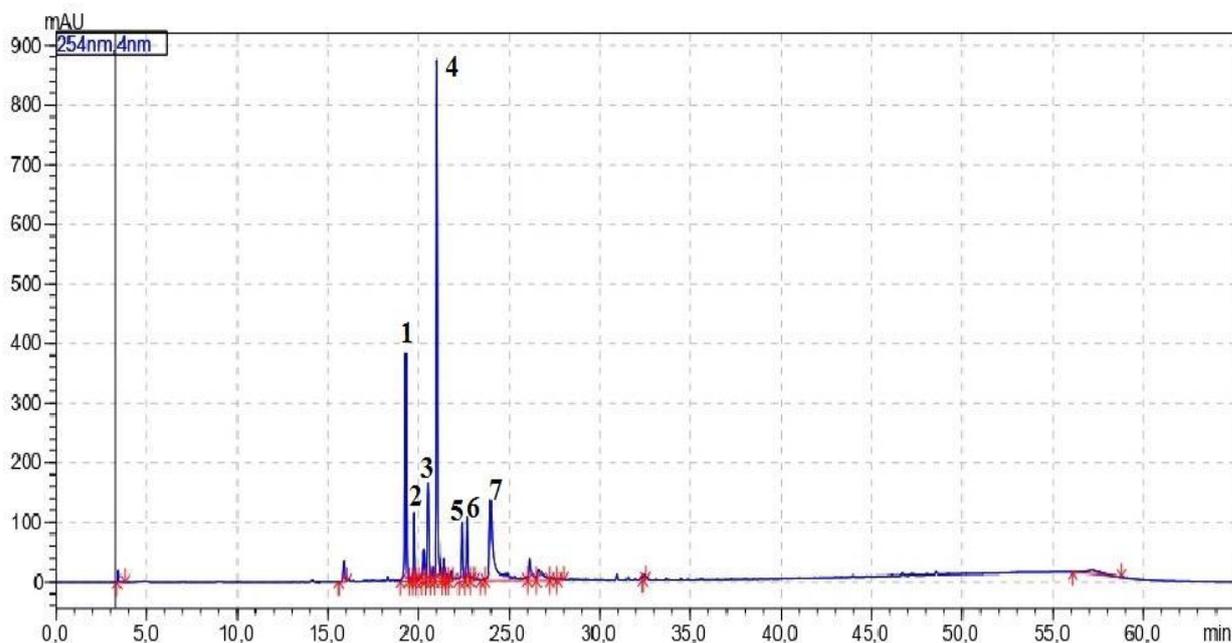


Рисунок 9. ВЭЖХ-УФ хроматограмма бутанольной фракции травы *Solidago canadensis* при длине волны 254 нм

Таблица 11. Интерпретация пиков хроматограммы бутанольной фракции

№ пика	Время удерживания мин	Максимумы поглощения, нм	Класс предполагаемого метаболита
1	19,287	254; 352	Флавонол-3-О-гликозид
2	19,747	254; 351	Флавонол-3-О-гликозид
3	20,511	243; 328	Фенолкарбоновая кислота
4	21,028	265; 343	Флавонол-3-О-гликозид
5	22,382	265; 346	Флавонол-3-О-гликозид
6	22,689	253; 354	Флавонол-3-О-гликозид
7	23,969	254; 370	Флавонол

Водно-спиртовой остаток. В водно-спиртовом остатке предполагается содержание 4 мажорных метаболитов фенольной природы (рисунок 10), большая часть которых полярнее соединений, отмеченных в бутанольной фракции. В таблице 12 представлены время удерживания, максимумы поглощения и предполагаемый класс основных вторичных метаболитов, обнаруженных при анализе хроматограммы.

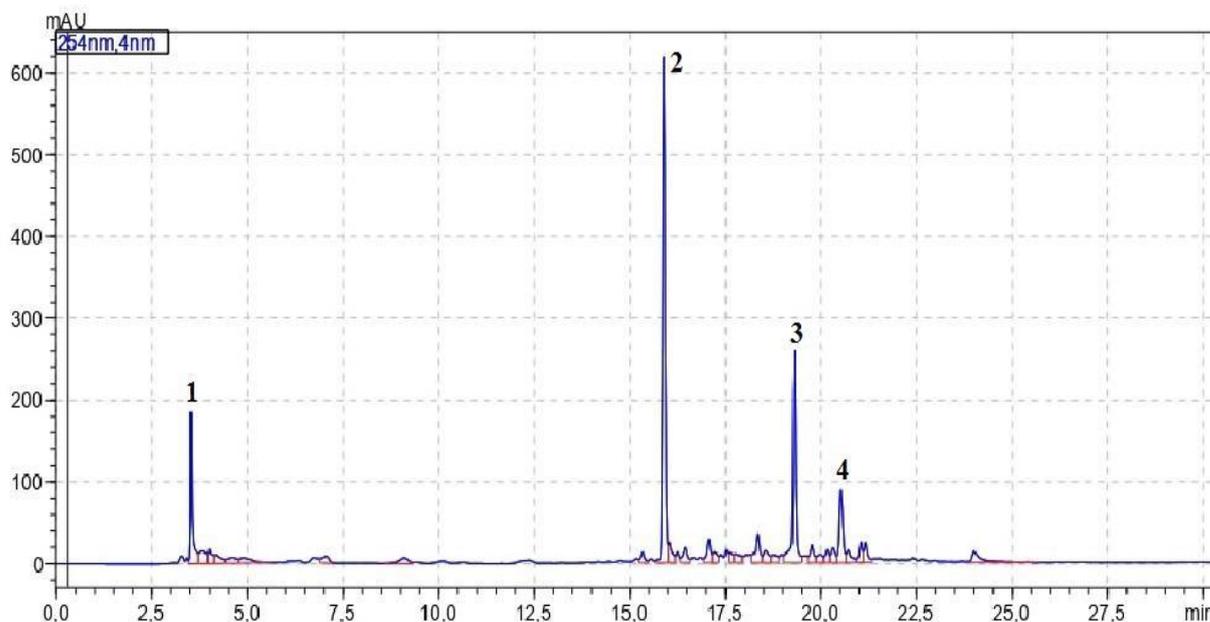


Рисунок 10. ВЭЖХ-УФ хроматограмма водно-спиртового остатка травы *Solidago canadensis* при длине волны 254 нм

Таблица 12. Интерпретация пиков хроматограммы водно-спиртового остатка

№ пика	Время удерживания мин	Максимумы поглощения, нм	Класс предполагаемого метаболита
1	3,521	263	Фенолкарбоновая кислота
2	15,893	231; 327	Флавонол-3-О-гликозид
3	19,303	254; 349	Фенолкарбоновая кислота
4	20,517	327	Фенолкарбоновая кислота

Благодаря наиболее полному разделению пиков, а также литературным данным и ранее полученным результатам БХ и ТСХ, согласно которым в бутанольной фракции предполагается наличие рутина и нарциссина, в качестве целевой фракции, используемой для выделения индивидуальных веществ, использовалась бутанольная фракция.

Выводы к главе 4:

1. С помощью хроматографических методов анализа фракций, наработанных и полученных исчерпывающей жидкость-жидкостной экстракцией сырья растворителями различной полярности (гексан, дихлорметан и бутанол) было установлено, что бутанольная фракция является оптимальной для выделения фенольных соединений в чистом виде. Кроме того, она содержит меньшее число липофильных балластных веществ, переходящих, преимущественно, в неполярные фракции (гексановую и дихлорметановую), что может значительно упростить выделение индивидуальных соединений и сократить их потери за счёт сокращения стадий очистки фракций.

2. Методы предварительного хроматографического анализа подтверждают литературные данные о наличии в надземной части золотарника канадского изокверцитрина, кемпферол-3-галактозида, рутина, нарциссина и кемпферол-3-рутинозида.

Глава 5. ВЫДЕЛЕНИЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ ИЗ ТРАВЫ *SOLIDAGO CANADENSIS* МЕТОДОМ ПРЕПАРАТИВНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ И ИХ ИДЕНТИФИКАЦИЯ

Бутанольную фракцию, наработанную при фракционировании и выбранную в качестве объекта для выделения индивидуальных веществ, концентрировали под вакуумом с использованием роторного испарителя при температуре 40°C до приблизительного объёма 100 мл и подвергли дальнейшей очистке методом эксклюзионной открытой колоночной хроматографии: фракцию наносили на колонку, наполненную сорбентом Sephadex LH-20, и подвергли градиентному элюированию спиртом этиловым различных концентраций – от 80 до 96% с шагом в 5%. Предварительный контроль элюирования проводился с помощью тонкослойной хроматографии в системах хлороформ:этанол (2:3) и БУВ (4:1:2). В результате были наработаны 4 подфракции, маркированные как BSx1; BSx2; BSx3; BSx4. Более детально степень разделения компонентов подфракций контролировалась через ВЭЖХ-УФ по полученным хроматограммам.

Из 4 полученных подфракций индивидуальные соединения были выделены с помощью препаративной ВЭЖХ.

Препаративная ВЭЖХ осуществлялась с использованием системы «Smartline» (Knauer, Германия) с применением спектрофотометрического детектора, снабженного колонкой для препаративной ВЭЖХ «Kromasil C18» (250 x 30 мм, 5 мкм). Подвижная фаза: ТФУ 0,1% в ультрачистой воде (компонент А); ТФУ 0,1% в ацетонитриле класса "для ВЭЖХ" (компонент В).

Условия препаративной хроматографии отражены в таблице 13.

Таблица 13. Условия препаративной ВЭЖХ

Время (мин)	Скорость потока элюента (мл/мин)	Содержание компонента А	Содержание компонента В

		(вода), % от общей массы элюента	(ТФУ), % в общей массы элюента
0,00	40,000	95	5
5,00	40,000	95	5
40,00	40,000	40	60
42,00	40,000	95	5

Аналитические ВЭЖХ-хроматограммы индивидуальных соединений, выделенных препаративным хроматографом, вместе с УФ-спектрами, были записаны на жидкостном хроматографе «Prominence LC-20» («Shimadzu», Япония) с хроматографической колонкой «Supelcosil» LC18 (250 x 4,6 мм, 5 мкм), оснащенный диодно-матричным детектором SPD-M20A. Температура анализа - 40°C. Подвижная фаза: ультрачистая вода (компонент А) с содержанием ТФУ 0,1%; ацетонитрил «J.T.Baker» (США) класса «для ВЭЖХ» (компонент В) с содержанием ТФУ 0,1%.

Условия аналитической хроматографии представлены в таблице 14

Таблица 14. Условия аналитической ВЭЖХ

Время (мин)	Скорость потока (мл/мин)	Концентрация компонента А (%)	Концентрация компонента В (%)
0,01	1,00	95	5
5,00	1,00	95	5
45,75	1,00	0	100
50,00	1,00	0	100
60,00	1,00	95	5
65,00	1,00	95	5

Из подфракции BSx1 в индивидуальном виде было получено 3 природных соединения (маркированные как SC1, SC2 и SC3 соответственно), из которых 2 (SC1 и SC2) были выделены в достаточных для определения их структуры методом ЯМР-спектроскопии количествах.

Аналитическая хроматограмма вещества SC1 (рисунок 11) показала наличие одного хроматографического пика с высокой интенсивностью и временем удерживания 23,687 мин.

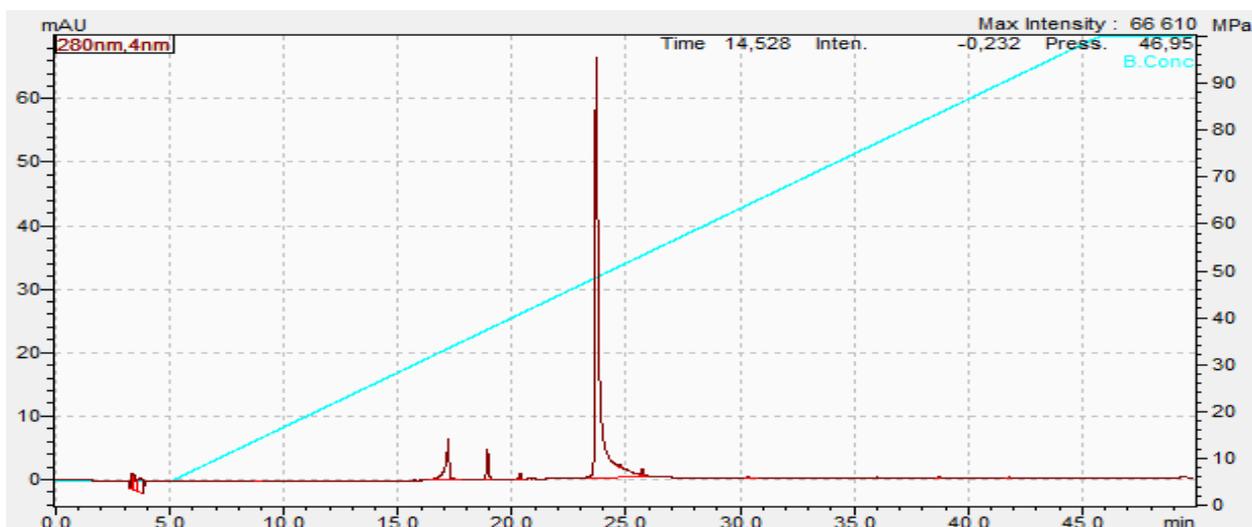


Рисунок 11. ВЭЖХ-УФ хроматограмма вещества SC1 при длине волны 280 нм

УФ-спектр анализируемого вещества показал два максимума поглощения при длинах волн 254 и 370 нм (рисунок 12).

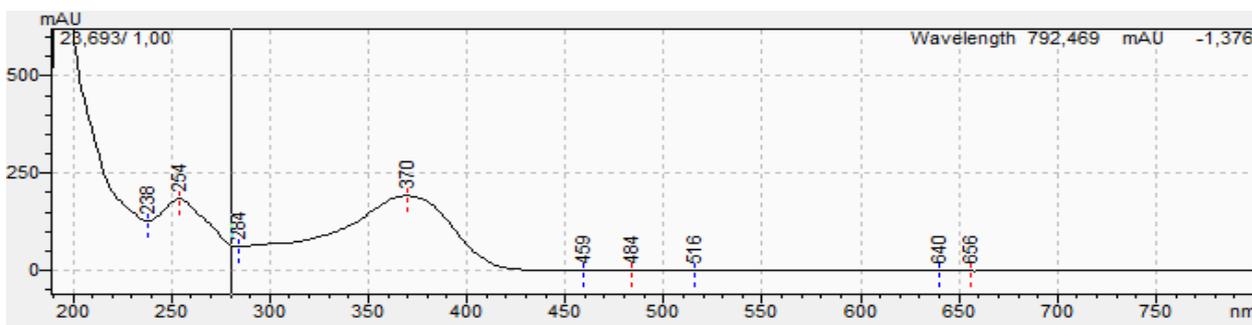


Рисунок 12. УФ-спектр вещества SC1

Для прогнозирования химических структур выделенных из подфракций веществ использовали метод масс-спектропии. Для соединения SC1 методом масс-спектрометрии установлено наличие иона $[M+H]^+$ m/z 303,0504 (рисунок 13).

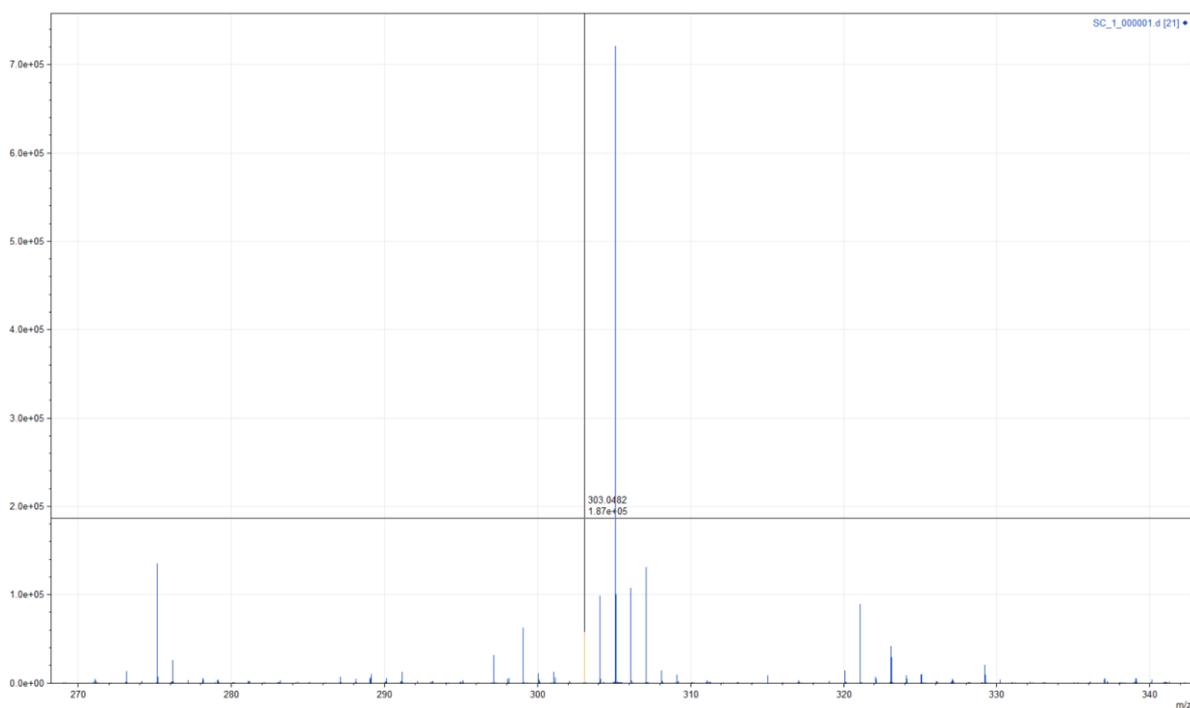


Рисунок 13. Масс-спектр соединения SC1

Данное соединение было выделено в виде желтого кристаллического вещества. Совокупные сведения аналитической ВЭЖХ, УФ-спектроскопии и масс-спектропии вместе с литературными данными позволяют предположить, что данное соединение имеет молекулярную формулу $C_{15}H_{10}O_7$.

Точные химические структуры выделенных индивидуальных соединений устанавливали методом ЯМР-спектроскопии.

Для этого, используя роторный испаритель, раствор, содержащий исследуемое вещество, упаривали досуха, диспергировали в воде, замораживали и подвергали лиофильной сушке. Высушенный порошок индивидуального вещества растворяли в дейтерированном диметилсульфоксиде и анализировали методом 1H -ЯМР для установления его химической структуры.

По результатам анализа 1H -ЯМР (рисунок 14) и с помощью литературных данных [55], была определена структура соединения выделенного вещества (таблица 15). Установлено, что соединением SC 1

является

3,3',4',5,7-пентагидроксифлавоон

(кверцетин).

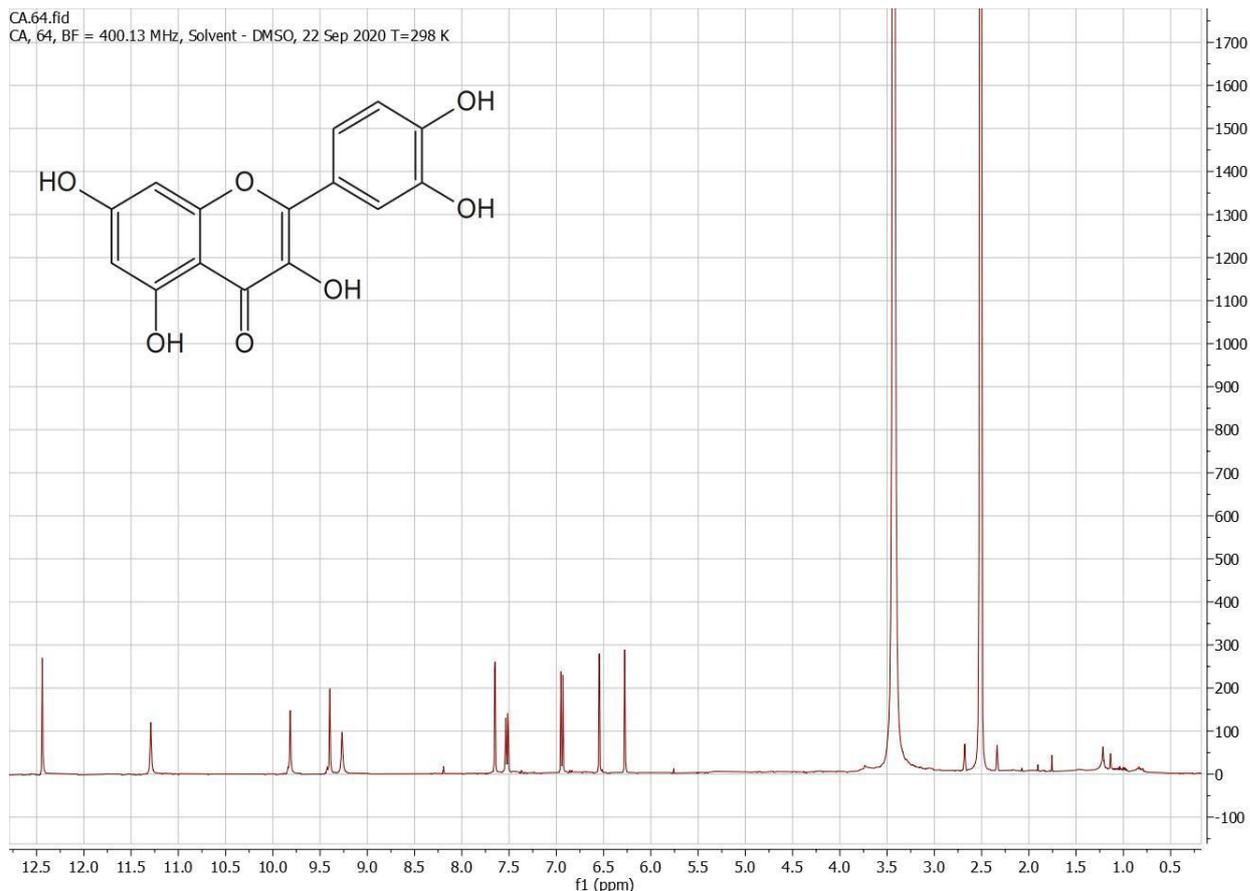


Рисунок 14. ¹H-ЯМР спектр (400 МГц, ДМСО) для соединения SC1 и его структура

Таблица 15. Данные ¹H-ЯМР-спектроскопии для соединения SC1

Н положение	Химический сдвиг
6-СН	6.27 (1H, д 1.9 Hz)
8-СН	6.54 (1H, д 1.9 Hz)
2'-СН	7.65 (1H, д 2.1 Hz)
5'-СН	6.94 (1H, д 8.5 Hz)
6'-СН	7.52 (1H, 8.5, 2.1 Hz)
3-ОН	9.26 (1H, с)
5-ОН	12.43 (1H, с)
7-ОН	11.29 (1H, с)
3'-ОН	9.31 (1H, с)

4'-ОН

9.81 (1H, c)

Аналитическая хроматограмма вещества SC2 (рисунок 15) показала наличие хроматографического пика с временем удерживания 20,905 мин.

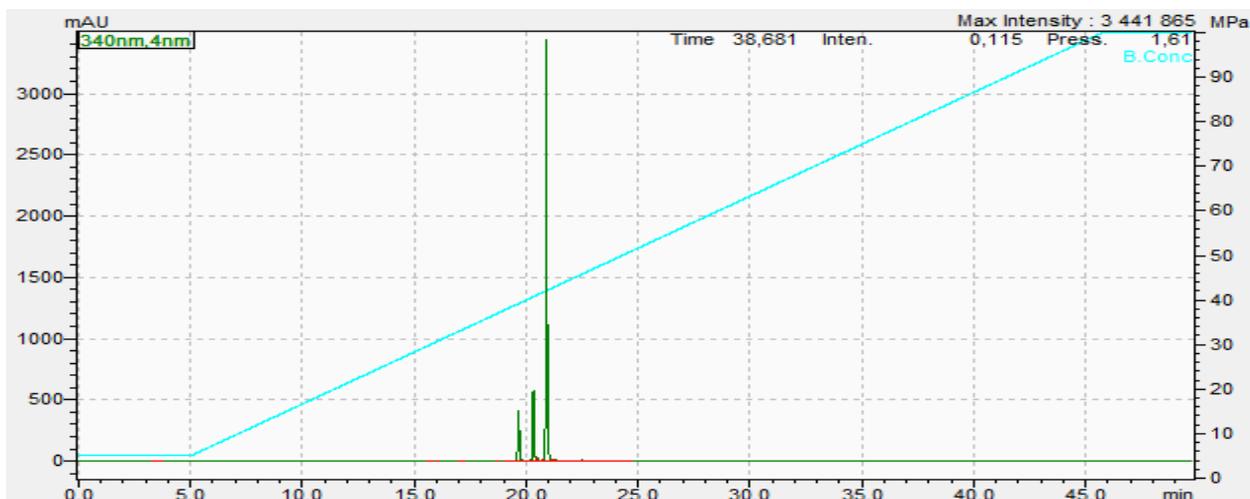


Рисунок 15. ВЭЖХ-УФ хроматограмма вещества SC2 при длине волны 340 нм

УФ-спектр анализируемого вещества показал три максимума поглощения при длинах волн 215, 249 и 349 нм, а также плато при длине волны 270 нм (рисунок 16).

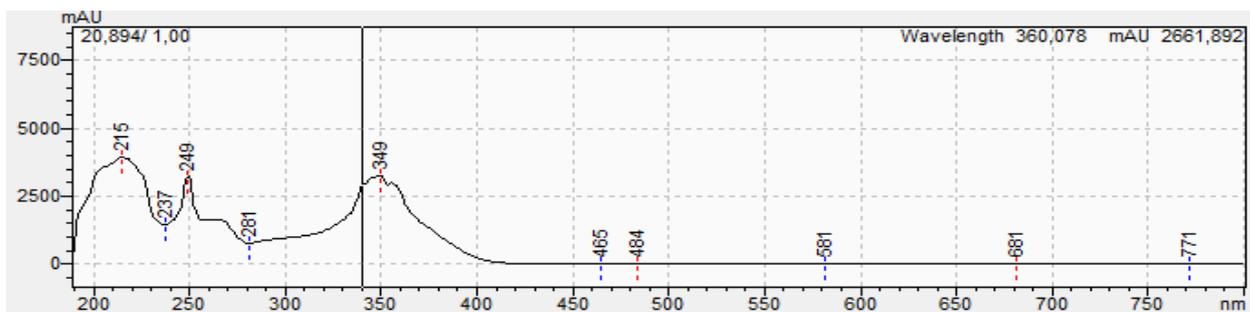


Рисунок 16. УФ-спектр вещества SC2

Методом масс-спектрометрии для соединения, маркированного как SC2 установлено наличие иона $[M+H]^+$ m/z 507,1138 (рисунок 17).

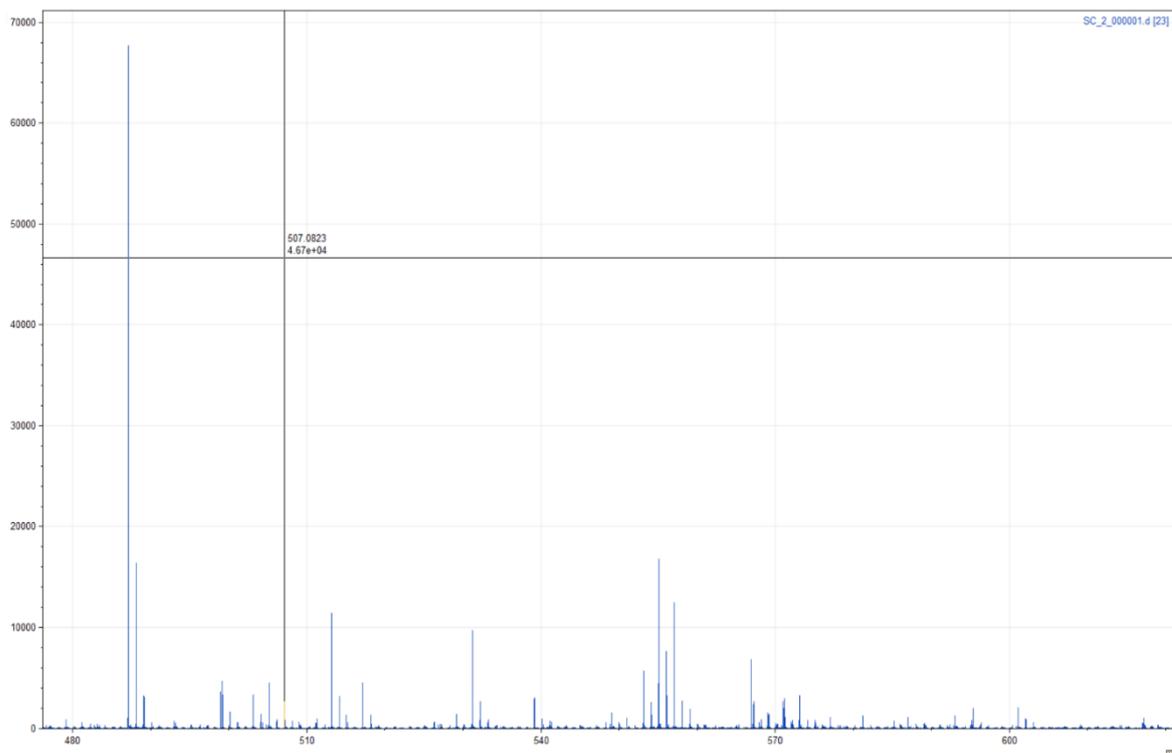


Рисунок 17. Масс-спектр соединения SC2

Соединение SC2 было выделено в виде желтого кристаллического вещества. Совокупные сведения аналитической ВЭЖХ, УФ-спектроскопии и масс-спектрографии вместе с литературными данными позволяют предположить, что данное соединение соответствует молекулярной формуле $C_{23}H_{22}O_{13}$.

Наличие и расположение ацетильной группы в 6''-положении в соединении SC2 было подтверждено 1H ЯМР-спектром (рисунок 18). Путем анализа ЯМР- (таблица 16) и масс-спектральных данных, а также сравнения их с литературными данными [43] вещество SC2 было идентифицировано как кверцетин-3-O- β -D-6''-ацетилглюкопиранозид.

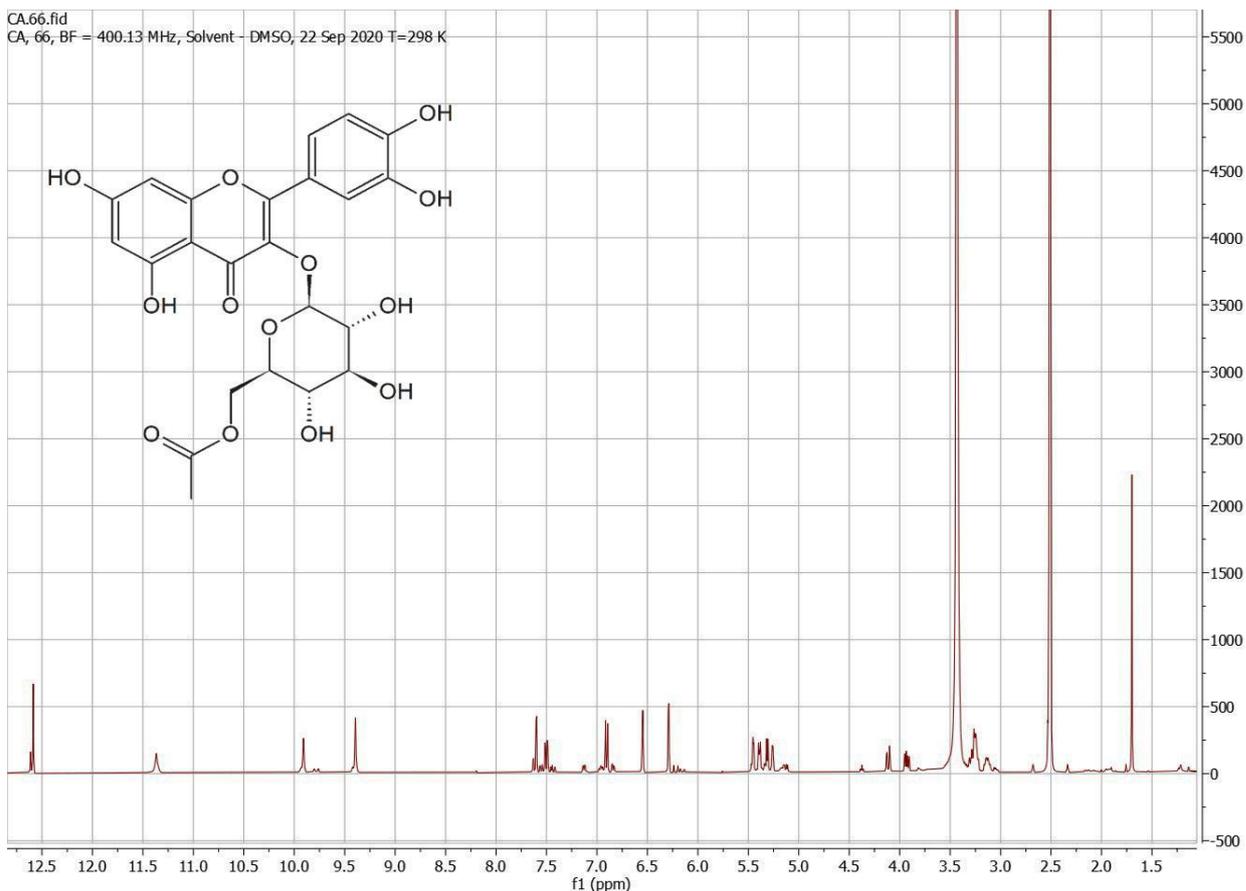


Рисунок 18. ^1H -ЯМР спектр соединения SC2 и его структура

Таблица 16. Данные ^1H -ЯМР-спектроскопии для соединения SC2

Н положение	Химический сдвиг
6-CH	6.29 (1H, д 1.9 Hz)
8-CH	6.54 (1H, д 1.9 Hz)
2'-CH	7.60 (1H, д 2.1 Hz)
5'-CH	6.90 (1H, д 8.5 Hz)
6'-CH	7.50 (1H, дд 8.5, 2.1 Hz)
1''-CH	5.38 (1H, д 7.4 Hz)
6a''-CH	4.11 (1H, дд 12.0, 1.7 Hz)
6b''-CH	3.92 (1H, дд 12.0, 6.2 Hz)
2''-5''-CH	3.0 - 3.35
6''-OAc	1.69 (3H, с)
5-OH	12.58 (1H, с)

7'-ОН	11.36 (1H, c)
3'-ОН	9.40 (1H, c)
4'-ОН	9.90 (1H, c)

Из подфракции BSx2 в индивидуальном виде было получено 3 природных соединения (маркированные как SC4, SC 5 и SC6 соответственно), однако количеств выделенных веществ было недостаточно для изучения их методом ЯМР-спектроскопии.

При анализе подфракции BSx3 методом ВЭЖХ-УФ был обнаружен единственный хроматографический пик с временем удерживания 19,65 мин (рисунок 19), принадлежащий соединению, маркированному как SC7.

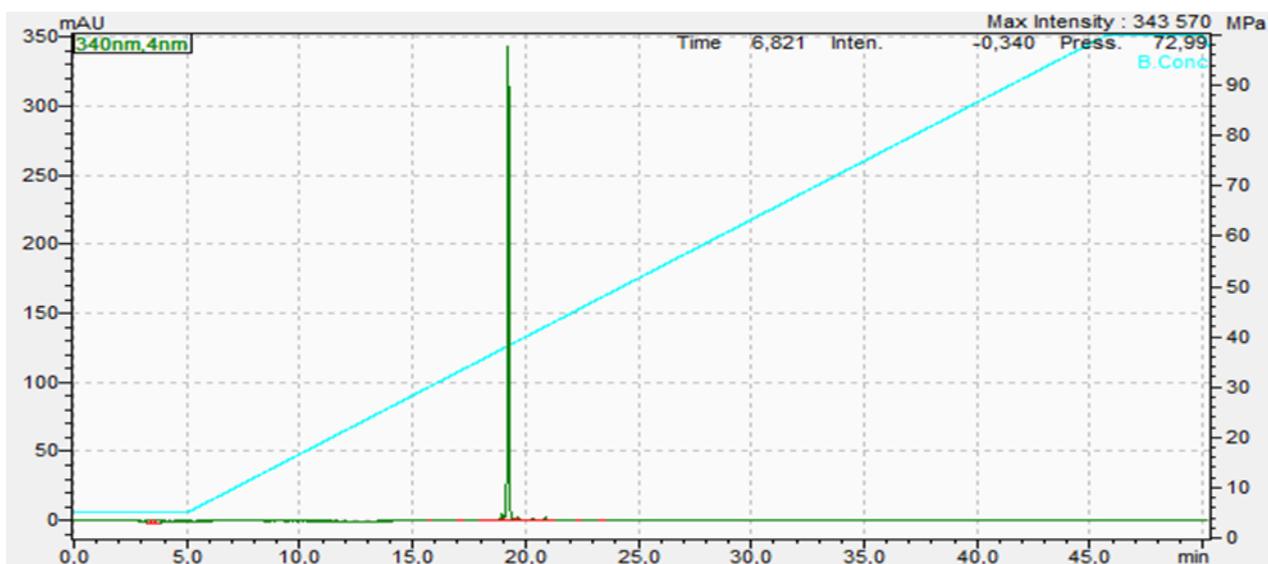


Рисунок 19. ВЭЖХ-УФ хроматограмма вещества SC7 при длине волны 340 нм

УФ-спектр анализируемого вещества показал два максимума поглощения при длинах волн 255 и 354 нм (рисунок 20).

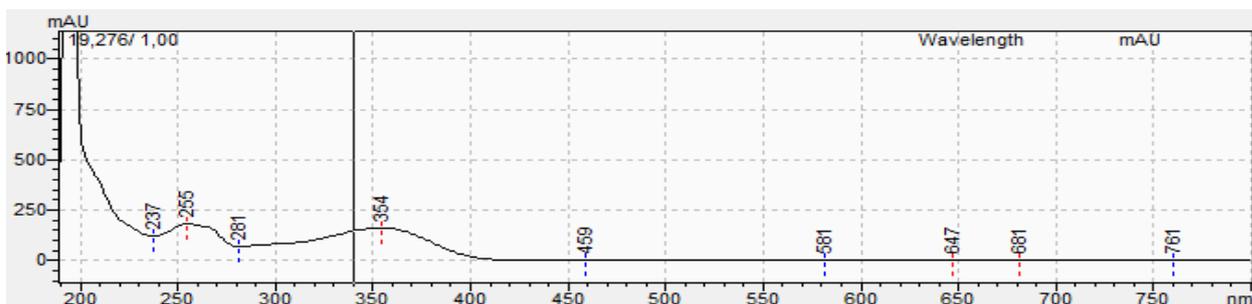
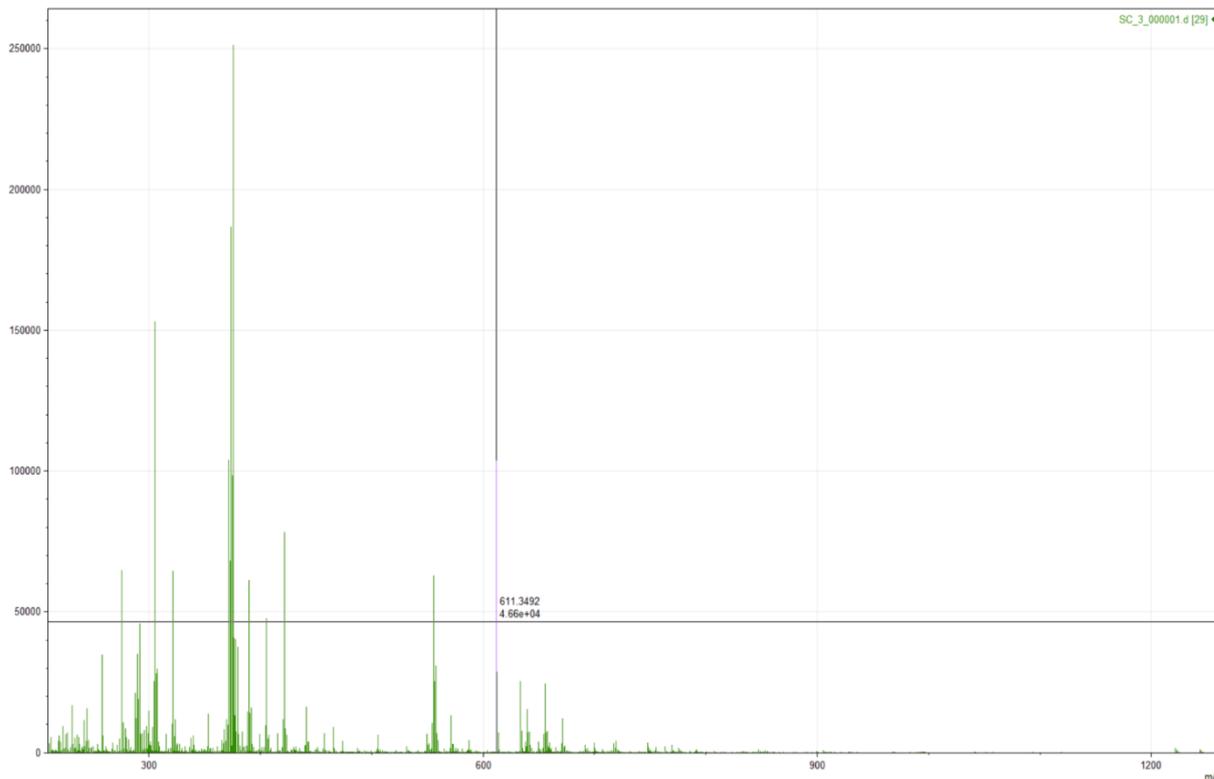


Рисунок 20. УФ-спектр вещества SC7

Методом масс-спектрометрии для соединения, маркированного как SC7, определено наличие иона $[M+H]^+$ m/z 611,1611 (рисунок 21).

**Рисунок 21.** Масс-спектр соединения SC7

Соединение SC7 было выделено в виде желтого кристаллического вещества. Совокупные сведения аналитической ВЭЖХ, УФ-спектроскопии и масс-спектропии вместе с литературными данными позволяют предположить, что данное соединение соответствует молекулярной формуле $C_{27}H_{30}O_{16}$.

Высушенный порошок индивидуального вещества, так же, как и в случае других веществ, растворяли в дейтерированном диметилсульфоксиде и анализировали методом 1H -ЯМР для установления его химической структуры.

Методом 1H -ЯМР (рисунок 22) и с помощью литературных данных [43] была определена химическая структура соединения выделенного вещества

(таблица 17). В результате было установлено, что соединением SC7 является рутин.

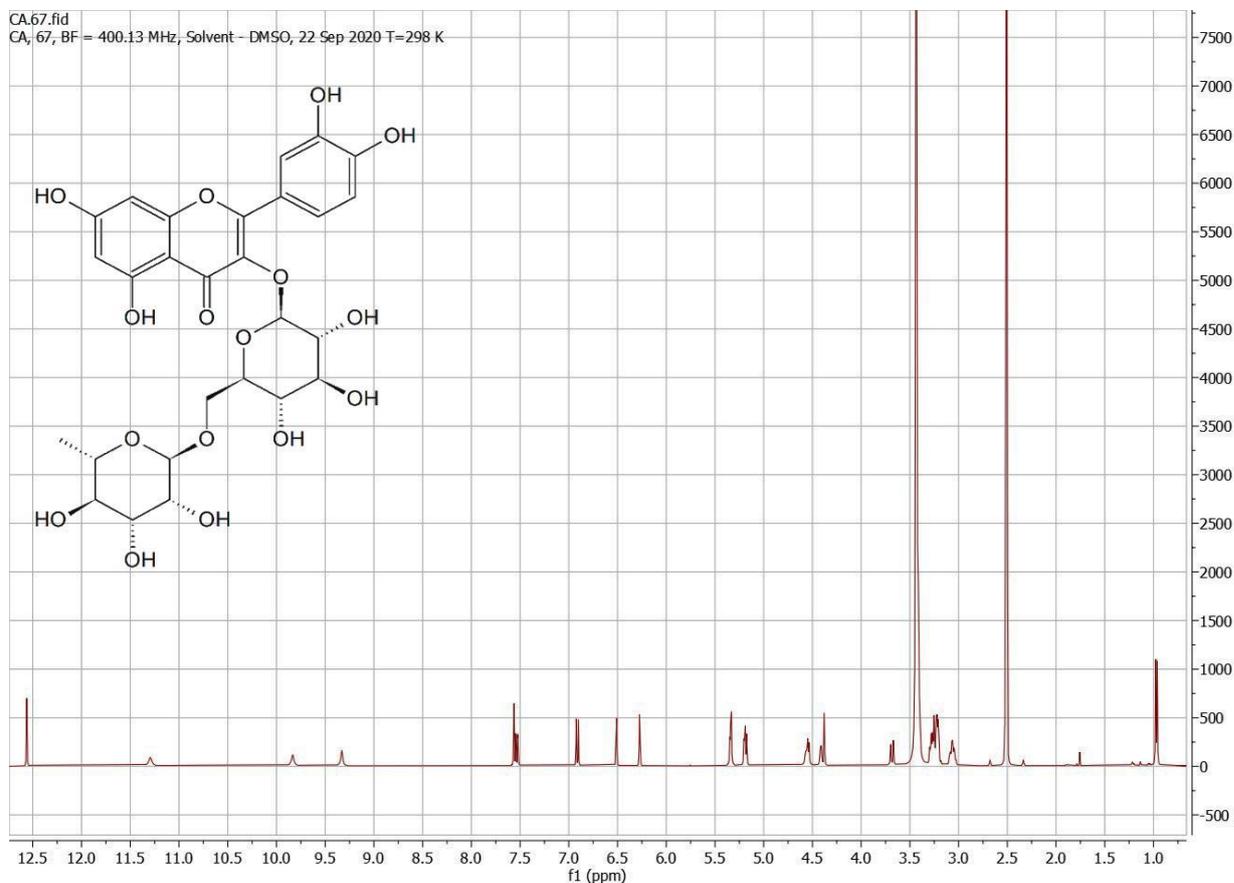


Рисунок 22. ^1H -ЯМР спектр соединения SC7 и его структура

Таблица 17. Данные ^1H -ЯМР-спектроскопии для соединения SC7

Н-положение	Химический сдвиг δH , (J в Гц)
6-CH	6.27 (1H, д 1.8 Hz)
8-CH	6.50 (1H, д 1.8 Hz)
2'-CH	7.56 (1H, д 2.2 Hz)
5'-CH	6.91 (1H, д 8.4 Hz)
6'-CH	7.53 (1H, дд 8.4, 2.2 Hz)
1''-CH	5.34 (1H, д 7.4 Hz)
1'''-CH	4.37 (1H, д 0.8 Hz)
6'''-CH ₃	0.97 (3H, д 6.1 Hz)

2''-6''-CH + 2'''-5'''CH	3.06 - 3.68
5-OH	12.56 (1H, c)
7-OH	11.29 (1H, c)
3'-OH	9.32 (1H, уш. c)
4'-OH	9.83 (1H, уш. c)

Из подфракции BSx4 с помощью препарата выделено одно соединение SC10.

Аналитическая хроматограмма вещества SC10 (рисунок 23) при длине волны 254 нм показала наличие хроматографического пика с временем удерживания 20,672 мин.

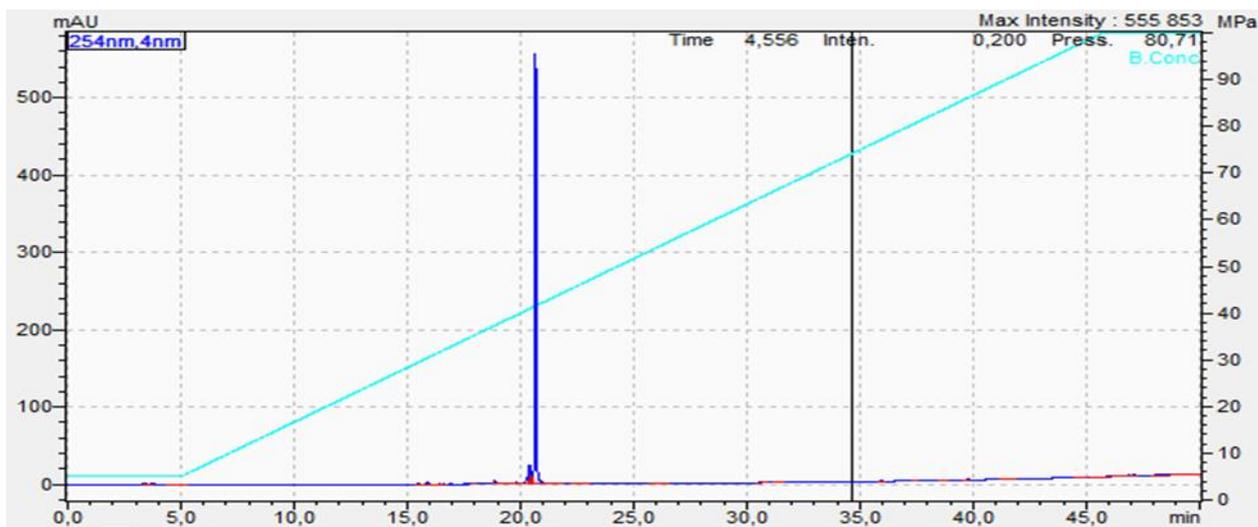


Рисунок 23. ВЭЖХ-УФ хроматограмма вещества SC10 при длине волны 254 нм

УФ-спектр исследуемого вещества показал два максимума поглощения при длинах волн 253 и 352 нм (рисунок 24).

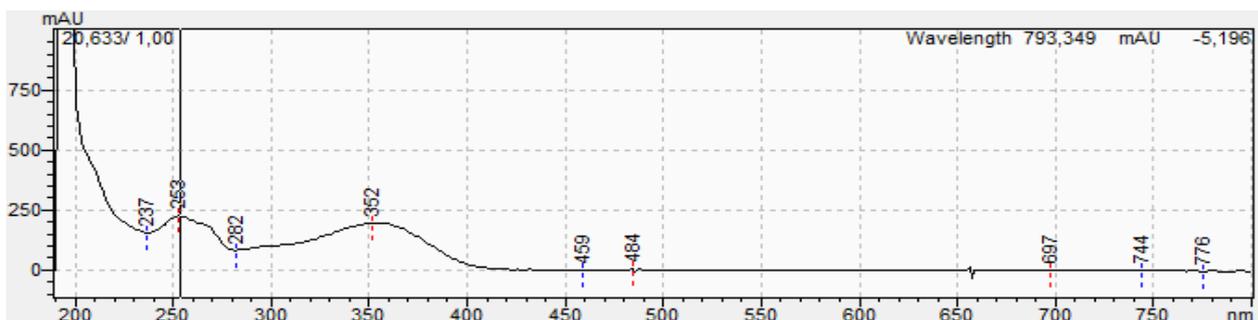
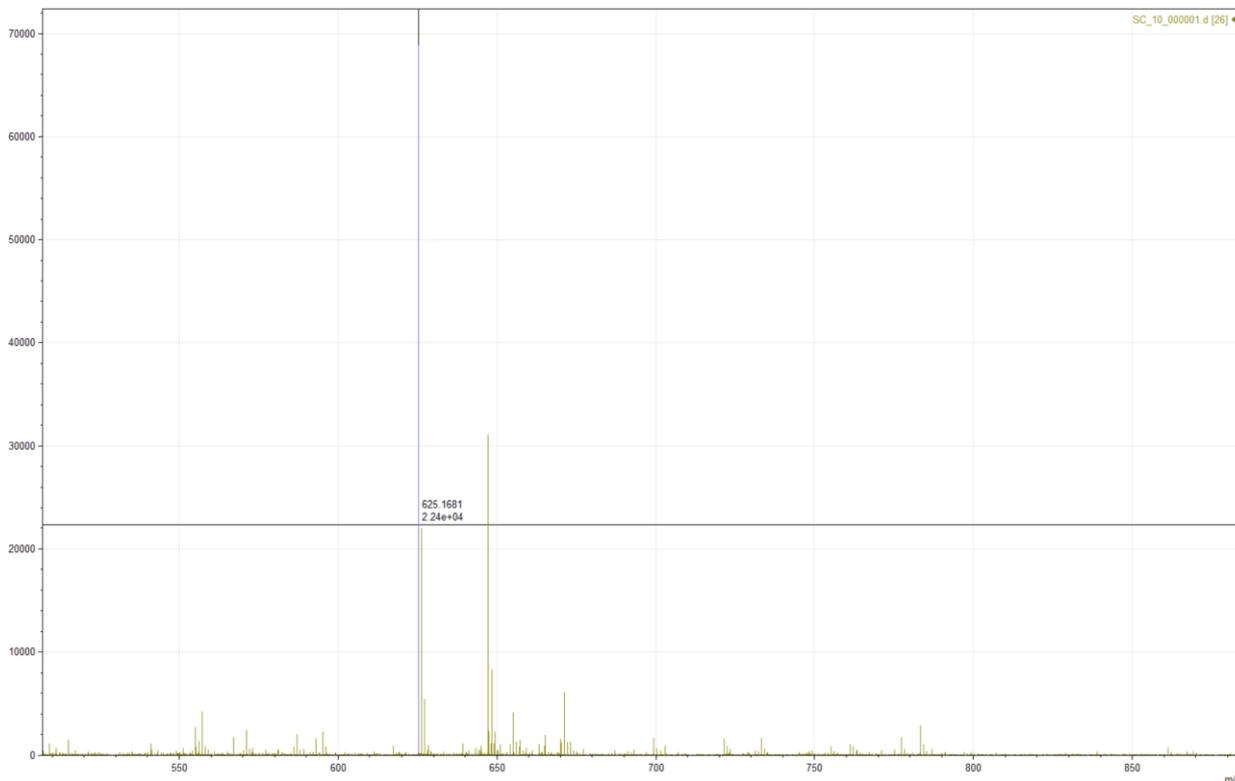


Рисунок 24. УФ-спектр вещества SC10

Методом масс-спектрометрии для соединения, маркированного как SC10, определено наличие сигнала иона $[M+H]^+$ m/z 625,1768 (рисунок 25).

**Рисунок 25.** Масс-спектр соединения SC10.

По результатам анализа ^1H -ЯМР (рисунок 26) и с помощью литературных данных [43], была интерпретирована структура выделенного вещества (таблица 18). Установлено, что соединением SC 10 является изорамнетин-3-О-рутозид (нарциссин).

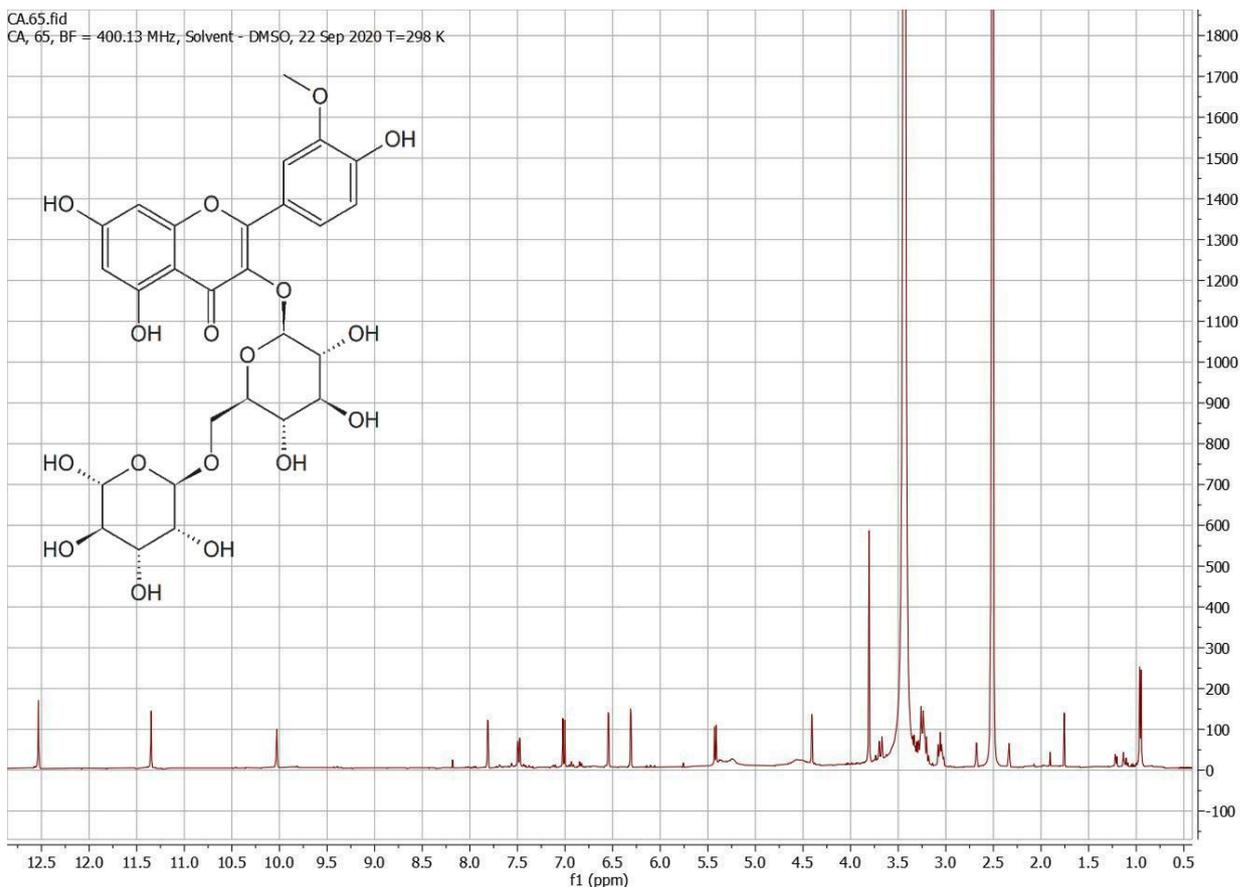


Рисунок 26. ^1H -ЯМР спектр соединения SC10 и его структура

Таблица 18. Данные ^1H -ЯМР-спектроскопии для соединения SC10

Н положение	Химический сдвиг
6-CH	6.31 (1H, д 2.0 Hz)
8-CH	6.54 (1H, д 2.0 Hz)
2'-CH	7.81 (1H, д 2.0 Hz)
5'-CH	7.01 (1H, д 8.5 Hz)
6'-CH	7.48 (1H, дд 8.5, 2.0 Hz)
1''-CH	5.42 (1H, д 7.5 Hz)
1'''-CH	4.41 (1H, уш. с)
6'''-CH ₃	0.95 (3H, д 6.1 Hz)
2''-6''-CH + 2'''-5'''CH	3.05 - 3.69
5-OH	12.53 (1H, с)
7-OH	11.34 (1H, с)

3'-ОН	10.02 (1H, c)
4'-ОМе	3.80 (3H,c)

Выводы к главе 5:

1. Впервые в чистом виде методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии были выделены 4 соединения: кверцетин, кверцетин-3-О- β -D-6''-ацетилглюкопиранозид, рутин и нарциссин.

2. Методами УФ-спектрофотометрии, ЯМР- и масс-спектроскопии была установлена и подтверждена их химическая структура.

3. Уточнённая схема и разработанная методика выделения индивидуальных веществ из травы *Solidago canadensis* позволяет существенно снизить потери выделяемых компонентов за счёт уменьшения количества стадий процесса выделения.

Глава 6. РАЗРАБОТКА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ МЕТОДИКИ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ *SOLIDAGO CANADENSIS*

Для разработки методики количественного определения флавоноидов было изучено влияние на выход суммы флавоноидов различных технологических параметров: концентрации экстрагента, времени, кратности и температурного режима экстракции, степени измельченности сырья.

Выбор стандартного образца индивидуального флавоноида осуществлялся на основании проведенных хроматографических и спектрофотометрических исследований отдельных компонентов, обнаруженных в образцах травы *Solidago canadensis*. Согласно литературным данным [2,47], а также данным хроматографического анализа, относительное содержание рутина в водно-спиртовом извлечении превышает содержание других флавоноидов, а максимумы поглощения комплексов с алюминия хлоридом рутина и суммы флавоноидов *Solidago canadensis* после реакции с раствором алюминия хлорида в длинноволновой области совпадают, поэтому именно это вещество предлагается в качестве стандартного образца.

Для установления аналитической длины волны регистрировали ультрафиолетовые спектры поглощения 80% спиртового извлечения из травы *Solidago canadensis*, к которому добавляли спиртовый раствор алюминия хлорида 2%. В качестве растворов сравнения использовали исходное извлечение в том же разведении, но без добавления комплексообразователя. Экстракцию сырья спиртом этиловым 80% проводили при нагревании на кипящей водяной бане с обратным холодильником. Полученное извлечение фильтровали в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводили до метки спиртом этиловым 80% (раствор А). 2 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили объем раствора спиртом этиловым 95% до метки (раствор Б). Затем проводили реакцию с комплексообразующей добавкой – алюминия хлоридом по следующей методике: в пробирку с

притертой пробкой помещали 2 мл раствора Б, добавляли 0,5 мл спиртового раствора алюминия хлорида 2% и 2,5 мл спирта этилового 95%. Через 20 мин измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны $\lambda=409$ нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения использовали следующий раствор: в пробирку помещали 2 мл раствора Б, прибавляли 1 каплю хлористоводородной кислоты и 3 мл спирта этилового 95%.

Параллельно измеряли оптическую плотность раствора СО рутина. Для этого 1 мл 0,02% спиртового раствора стандарта помещали в мерную колбу объемом 50 мл, прибавляли 4 мл спиртового раствора хлорида алюминия 2% и доводили до метки этиловым спиртом 95%. Измерение оптической плотности данного раствора проводили относительно этилового спирта 95%. При исследовании спектров поглощения спиртового извлечения из травы *Solidago canadensis* в присутствии спиртового раствора алюминия хлорида было установлено, что максимум поглощения дифференциального спектра наблюдается при длине волны $\lambda=409$ нм (рисунок 27).

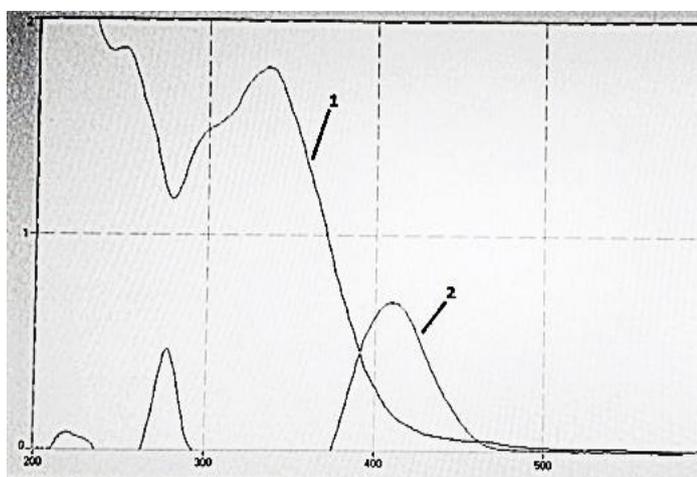


Рисунок 27. УФ-спектры водно-спиртового извлечения из травы *Solidago canadensis*: 1 – спиртовое извлечение 80%-ное; 2 – извлечение с добавлением раствора алюминия хлорида

Примечание: ось абсцисс – длина волны (нм), ось ординат – оптическая плотность.

При этом максимумы поглощения комплексов с алюминия хлоридом рутина и суммы флавоноидов *Solidago canadensis* в длинноволновой области совпадают (рисунок 28).

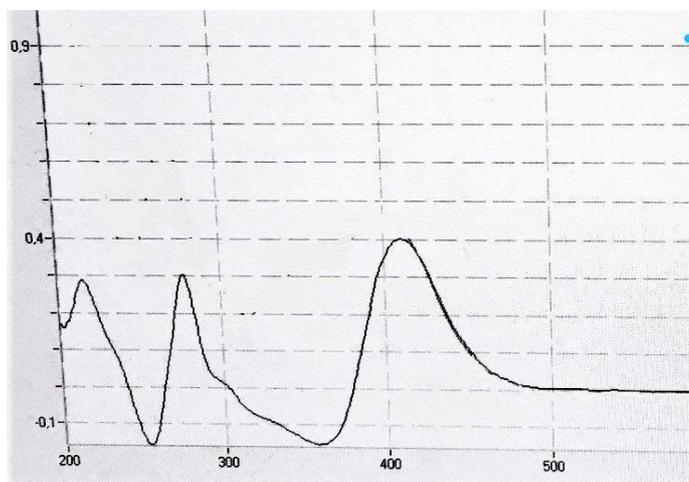


Рисунок 28. УФ-спектр спиртового раствора рутина с добавлением алюминия хлорида

Примечание: ось абсцисс – длина волны (нм), ось ординат – оптическая плотность.

Таким образом, при исследовании УФ спектров спиртовых извлечений, содержащих комплекс флавоноидов и раствора СО рутина с хлоридом алюминия было установлено, что их максимумы поглощения оказались совпадают при длине волны 409 ± 2 нм. Это значение и было взято в качестве аналитической длины волны.

6.1. Подбор условий экстракции флавоноидов из сырья

При подборе условий экстракции суммы флавоноидов из сырья были учтены значения следующих параметров:

- 1) Оптимальный экстрагент (вода, этиловый спирт 60%, 70%, 80% и 90%);
- 2) Степень измельчения сырья (частицы, проходящие сквозь сито с диаметрами отверстий 1, 2 и 3 мм);
- 3) Длительность процесса экстракции (30, 60, 90 и 120 минут);

- 4) Время реакции исследуемого раствора, содержащего флавоноиды, с раствором алюминия хлорида (30, 40, 50 и 60 минут);
- 5) Температурный режим экстракции (60°C, 80°C и 100°C);
- 6) Количество добавляемого к исследуемому раствору, содержащему флавоноиды, реактива-комплексообразователя (1, 2, 3, 4 и 5 мл);
- 7) Количество добавляемого реактива-комплексообразователя к раствору стандартного образца рутина (1, 2 и 3 мл).

Результаты исследований представлены в таблицах 19-25.

1) *Подбор оптимального экстрагента*

Первый этап исследований заключался в подборе оптимального экстрагента. В качестве экстрагентов использовали воду очищенную и спирт этиловый различной концентрации: 60%, 70%, 80% и 90%. Экстракцию осуществляли по следующей методике: около 1 г (точная навеска) измельченного сырья с размером частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм, помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 30 мл соответствующего растворителя, колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охлаждали до комнатной температуры и извлечение фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию сырья проводили еще два раза указанным выше способом. Полученные извлечения фильтровали через тот же фильтр в ту же мерную колбу, фильтр промывали растворителем и доводили объем фильтрата до метки (раствор А).

2 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводили объем раствора спиртом 95% до метки (раствор Б). Далее в пробирку помещали 2 мл раствора Б, приливали 0,5 мл раствора алюминия хлорида 2% в спирте этиловом 95% и 2,5 мл спирта этилового 95%. Через 30 мин измеряли оптическую плотность полученного раствора на спектрофотометре при длине волны $\lambda=409$ нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали следующий раствор: в пробирку с помощью пипетки

помещали 2 мл раствора Б, прибавляли 1 каплю кислоты хлористоводородной и 3 мл спирта этилового 95%.

Параллельно измеряли оптическую плотность раствора СО рутина. 1 мл спиртового раствора рутина 0,02% помещали в мерную колбу на 50 мл, прибавляли 4 мл раствора алюминия хлорида 2% и доводили до метки спиртом этиловым 95%. Измерение оптической плотности данного раствора проводили относительно спирта этилового 95%. Данные по содержанию флавоноидов в зависимости от концентрации экстрагента представлены в таблице 19.

Таблица 19. Содержание флавоноидов в зависимости от концентрации спирта этилового

Природа и концентрация экстрагента (%)	Содержание флавоноидов, %
Вода	4,83
Спирт этиловый, 90%	6,63
Спирт этиловый, 80%	7,46
Спирт этиловый, 70%	7,14
Спирт этиловый, 60%	6,81

В результате установлено, что спирт этиловый 80% является оптимальным экстрагентом, обеспечивающим наиболее высокий выход флавоноидов.

2) Подбор оптимальной степени измельченности сырья

Для изучения степени измельченности сырья на выход флавоноидов были проанализированы образцы травы *Solidago canadensis* с размером частиц 1, 2 и 3 мм.

По 1 г измельченного сырья (точная навеска) с размером частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1, 2 или 3 мм соответственно, помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляли 30 мл спирта этилового 80%. Экстракцию и измерение оптической

плотности проводили по методике, описанной выше. Результаты представлены в таблице 20.

Таблица 20. Содержание флавоноидов в зависимости от степени измельченности сырья

Размер частиц сырья, мм	Содержание флавоноидов, %
1	7,13
2	7,01
3	4,49

Полученные данные показали, что максимальный выход суммы флавоноидов достигается при экстракции сырья, измельченного до размера частиц, проходящих через сито с диаметром отверстий 1 мм.

3) Подбор оптимальной длительности экстракции

Важнейшим параметром, влияющим на выход целевой группы веществ из ЛРС, является время экстрагирования. В ходе эксперимента проводилось исследование, целью которого было определение времени экстракции, при котором достигается наибольший выход суммы флавоноидов. Экстрагирование проводили на кипящей водяной бане в течение 30, 60, 90 и 120 мин по методике, описанной выше. Результаты представлены в таблице 21.

Таблица 21. Содержание флавоноидов в зависимости от времени экстракции

Длительность экстракции, мин	Содержание флавоноидов, %
30	5,87
60	7,85
90	8,05
120	7,25

Результаты свидетельствуют, что максимальное содержание флавоноидов при однократном настаивании сырья наблюдается при времени экстракции 90 минут.

4) *Подбор оптимального времени реакции исследуемого раствора, содержащего флавоноиды, с раствором алюминия хлорида*

Одним из этапов разработки методики количественного определения стал подбор оптимального времени реакции суммы флавоноидов с раствором алюминия хлорида. Экстрагирование проводили на кипящей водяной бане в течение 90 мин по методике, описанной выше. После добавления раствора алюминия хлорида оптическую плотность полученного раствора измеряли через 30, 40, 50, и 60 мин. Результаты представлены в таблице 22.

Таблица 22. Значения оптической плотности 80% спиртового извлечения из сырья после добавления 1 мл 2% раствора алюминия хлористого через разные промежутки времени

Время, мин	Оптическая плотность
30	0,628
40	0,627
50	0,620
60	0,620

Полученные данные демонстрируют, что оптическая плотность растворов при добавлении раствора алюминия хлорида не увеличивалась после 30 мин с момента добавления реактива, оставаясь стабильной. Таким образом, оптимальным временем реакции комплексообразования флавоноидов с раствором алюминия хлорида можно считать 30 минут.

5) *Подбор температурного режима экстракции*

Существенное влияние на скорость процесса экстрагирования и полноту извлечения флавоноидов из растительного сырья оказывает температурный режим экстракции. Было изучено влияние температуры на выход флавоноидов

и установлено, что максимальное содержание этой группы веществ при однократном настаивании сырья наблюдается при температуре 100°C. Результаты представлены в таблице 23.

Таблица 23. Содержание флавоноидов в зависимости от температурного режима экстракции

Температура экстракции, °С	Содержание флавоноидов, %
60	7,52
80	7,57
100	7,85

б) Подбор количества добавляемого реактива-комплексобразователя к исследуемому раствору, содержащему флавоноиды

Для установления оптимальных условий реакции комплексообразования проводилось исследование зависимости процентного содержания суммы флавоноидов от количества добавленного к исследуемому раствору раствора алюминия хлорида 2% в спирте этиловом 95%. Результаты представлены в таблице 24.

Таблица 24. Зависимость процентного содержания суммы флавоноидов в исследуемом извлечении от количества 2% раствора алюминия хлорида

Количество добавленного AlCl_3 2%, мл	Содержание флавоноидов, %
1	7,24
2	7,34
3	7,63
4	7,71
5	7,46

Максимальное значение содержания суммы флавоноидов определено после добавления к исследуемому извлечению 4 мл 2% раствора алюминия хлористого.

7) *Подбор количества добавляемого реактива-комплексобразователя к раствору стандартного образца рутина*

Значение оптической плотности раствора стандартного образца рутина также зависит от количества добавленного к исследуемому раствору раствора алюминия хлорида 2%. Исходя из полученных данных, максимальное значение оптической плотности раствора СО рутина достигается при добавлении 2 мл раствора алюминия хлорида 2%. Результаты представлены в таблице 25.

Таблица 25. Зависимость величины оптической плотности раствора СО рутина от количества добавленного раствора алюминия хлорида 2%

Количество добавленного $AlCl_3$ 2%, мл	Величина оптической плотности
1	0,378
2	0,379
3	0,373

Результаты исследований показывают, что максимальное извлечение флавоноидов из травы *Solidago canadensis* достигается экстракцией сырья с размером частиц 1 мм этиловым спиртом 80%. Также предлагается экстрагирование флавоноидов проводить при температуре кипения водяной бани в течение 90 минут, при этом восполнение потери растворителя в результате нагревания проводить путем взвешивания колбы с навеской сырья и добавленного экстрагента после окончания нагревания и последующего охлаждения колбы до комнатной температуры.

6.2. Проверка воспроизводимости методики количественного определения

Для проверки воспроизводимости методики было проведено количественное определение флавоноидов на примере одного образца для шести независимых определений, в результате чего было установлено, что содержание флавоноидов в траве *Solidago canadensis* в пересчете на рутин составляет $7,33 \pm 0,35\%$. Относительная ошибка среднего значения содержания флавоноидов в траве *Solidago canadensis* с доверительной вероятностью 95% составляет 4,44%.

С помощью предлагаемой методики были проанализированы образцы травы *Solidago canadensis*, собранные в фазу бутонизации и цветения в Ленинградской области и в Чехии. Для установления оптимальных размеров сырья *Solidago canadensis* и рекомендаций по его заготовке с учетом содержания в сырье суммы флавоноидов было проведено их количественное определение в различных частях растения (листьях, соцветиях и стеблях). Учитывая, что длина стеблей достигает 100 см и более, дополнительно было проведено определение содержания флавоноидов в верхней (длиной от верхушки до 40 см), средней (от 40 до 80 см) и нижней трети стебля (таблица 26).

Таблица 26. Данные по содержанию суммы флавоноидов в различных образцах и частях сырья *Solidago canadensis*

Содержание суммы флавоноидов в различных образцах сырья <i>Solidago canadensis</i>	
Место и время сбора сырья	Содержание флавоноидов (%)
Ленинградская область, Всеволожский район, пос. Лемболово, питомник лек. растений СПХФУ, июль 2016	$7,85 \pm 0,37$
Чехия, окрестности г. Прага, август 2017	$6,67 \pm 0,31$

Ленинградская область, Всеволожский район, пос. Лемболово, питомник лек. растений СПХФУ, август 2018	7,33±0,34
Содержание суммы флавоноидов в отдельных частях растения	
<i>Орган растения</i>	<i>Содержание флавоноидов (%)</i>
Стебли	2,75±0,12
Листья	9,12±0,28
Соцветия	7,8±0,24
Содержание суммы флавоноидов в различных частях стебля	
<i>Исследуемая часть стебля</i>	<i>Содержание флавоноидов (%)</i>
Верхняя (от верхушки до 40 см)	2,75±0,12
Средняя (от 40 до 80 см)	1,10±0,08
Нижняя	0,52±0,06

Полученные результаты дают основание рекомендовать для заготовки верхушки побегов длиной до 40 см, отделяя грубые стебли нижней части растений, диаметр которых составляет более 7 мм.

6.3. Валидация методики количественного определения

Ещё одним этапом исследования было проведение валидации разработанной методики. Для определения линейности методики, взяты 5 различных навесок сырья и получены извлечения с применением оптимальных условий экстракции. Согласно разработанной методике, с каждым проведена реакция со спиртовым раствором алюминия хлорида 2%. Результаты эксперимента приведены в таблице 27 и на рисунке 29.

Таблица 27. Оценка линейности методики количественного определения суммы флавоноидов в траве *Solidago canadensis*

Навеска сырья, г	Оптическая плотность	Содержание суммы	Уравнение регрессии и
------------------	----------------------	------------------	-----------------------

	исследуемого извлечения	флавоноидов (мкг/мл)	коэффициент корреляции
1,2010	0,616	77,67	$Y=0,000043+0,00793$ x $R^2=0.9999$
1,0128	0,502	63,30	
0,8050	0,412	51,95	
0,6048	0,326	41,10	
0,4071	0,209	26,35	

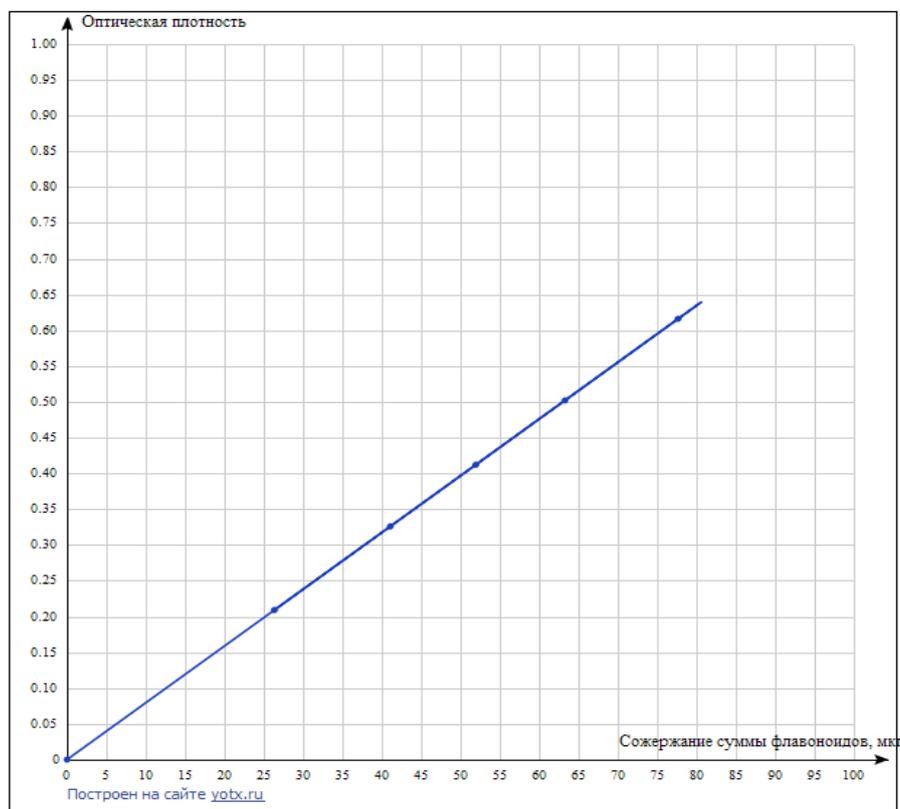


Рисунок 29. График зависимости величины оптической плотности спиртовых извлечений от содержания суммы флавоноидов

Примечание: ось абсцисс – содержание суммы флавоноидов, мкг; ось ординат – оптическая плотность

Градуировочный график имеет линейный характер, а коэффициент корреляции близок к единице. Таким образом, можно сделать вывод о линейности методики.

Специфичность методики определяли путем сравнения спектров испытуемого раствора со спектром СО рутина после проведения реакции с хлоридом алюминия. Растворы готовили в соответствии с вышеприведенной методикой. Регистрацию спектров проводили в диапазоне длин волн от 200 до 800 нм. Критерием приемлемости специфичности являлось совпадение максимумов поглощения дифференциальных спектров рутина и суммы флавоноидов, извлеченных из травы *Solidago canadensis* (рисунок 30).

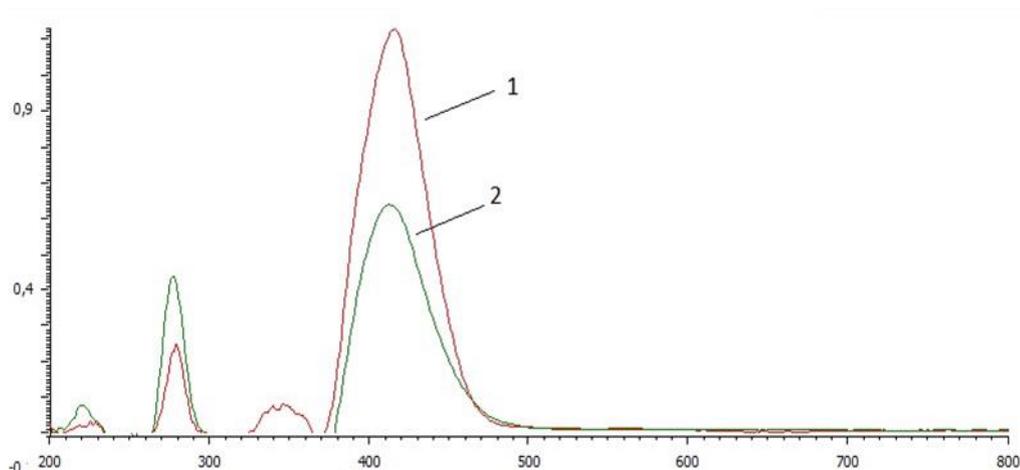


Рисунок 30. Дифференциальные спектры поглощения комплексов спиртовых растворов рутина (1) и суммы флавоноидов травы *Solidago canadensis* (2) с добавкой хлорида алюминия

Примечание: ось абсцисс – длина волны (нм), ось ординат – оптическая плотность.

Как видно на рисунке 30, характер дифференциальных спектров совпадает, максимумы находятся при аналитической длине волны 409 нм. Таким образом, сопутствующие вещества, переходящие в раствор при экстрагировании сырья, не искажают результат, чем подтверждается специфичность разработанной методики.

Установлено, что влияние растворителя на спектр поглощения извлечения минимально и существенно не сказывается на результатах анализа (рисунок 31).

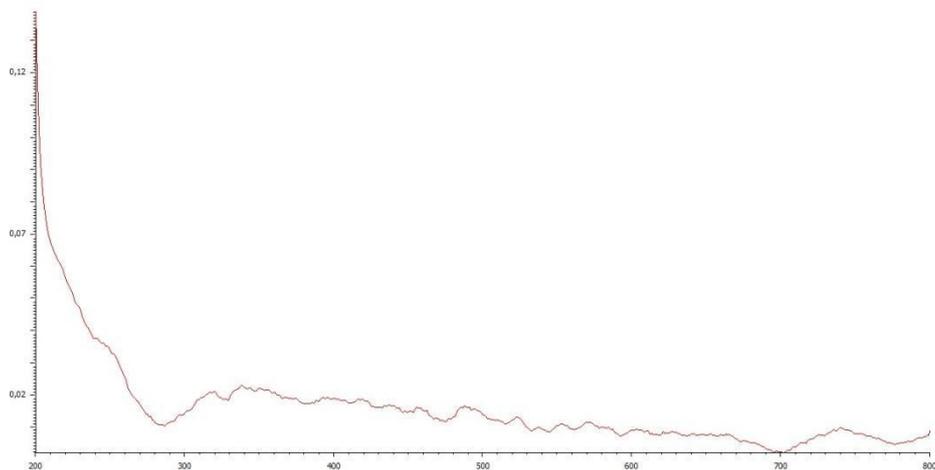


Рисунок 31. Спектр поглощения растворителя с добавлением раствора хлорида алюминия

Для определения *правильности* методики (отсутствия систематической ошибки) использовали метод добавок. Правильность методики определялась на одном образце сырья в трех разных навесках. Производилось измерение количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин в 9 растворах, полученных путем добавления необходимого количества СО рутин к исследуемому раствору (таблица 28).

Таблица 28. Оценка правильности методики количественного определения суммы флавоноидов в траве *Solidago canadensis*

Масса навески и сырья, г	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин, мкг/мл	Добавлено СО рутин, мкг	Расчетное содержание суммы флавоноидов в мкг	Найденное содержание суммы флавоноидов в мкг	Открываемость (R), %
0,8071	21,52	5	26,52	26,16	98,64
	21,52	10	31,52	31,45	99,77
	21,52	15	36,52	36,03	98,65

1,0029	26,65	5	31,65	31,34	99,03
	26,65	10	36,65	37,05	101,08
	26,65	15	41,65	40,83	98,04
1,2061	31,31	5	36,31	36,65	100,94
	31,31	10	41,31	41,14	99,59
	31,31	15	46,31	45,83	98,96
Метрологические характеристики: R= 99,41; $\Delta x=0,883$; SD=1,085; RSD=1,0914					

Критерий приемлемости — средний процент восстановления, скорректированный на 100%, и его средняя величина должна находиться в пределах 98-102%. Эксперименты с добавками СО рутина к аликвоте показали отсутствие систематической ошибки и правильность разработанной методики.

На основании полученных данных можно утверждать, что совокупность однородна и полученным данным можно доверять.

Робастность методики устанавливали путем определения стабильности испытуемого раствора сравнением величины оптической плотности через равные промежутки времени в течение 48 часов. Исследовалось влияние времени и пониженной температуры хранения на исследуемый раствор. В результате было установлено, что величина оптической плотности извлечения оставалась неизменной на протяжении 48 часов при влиянии обоих факторов. Разность между величиной оптической плотности не превышала 3% относительно исходной.

Выводы к главе 6:

1. Уточнена и валидирована методика количественного определения суммы флавоноидов в траве *Solidago canadensis*. Для стандартизации данного лекарственного растительного сырья предлагается использовать метод дифференциальной спектрофотометрии по реакции комплексообразования флавоноидов с алюминия хлоридом (III). Подобранные условия экстракции

флавоноидов из сырья позволяют достичь высокого (7-8%) выхода целевой группы веществ.

2. Полученные результаты сравнительного изучения количественного содержания суммы флавоноидов в различных частях растения дают основание рекомендовать для заготовки верхушки побегов длиной до 40 см, отделяя грубые стебли нижней части растений, диаметр которых составляет более 7 мм.

3. Разработанная методика количественного определения суммы флавоноидов и установленные параметры сырья для заготовки могут быть использованы для внесения дополнений в проект ФС «Золотарника канадского трава – *Solidaginis canadensis herba*».

Глава 7. МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ И АНАТОМО- ДИАГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ТРАВЫ *SOLIDAGO CANADENSIS*

7.1. Морфологическое описание травы *Solidago canadensis*

Цельное сырьё представлено облиственными сухими верхушками побегов, отдельными листьями, соцветиями и их частями, кусочками стеблей.

Листья простые, опушённые с обеих сторон, в верхней части стебля яйцевидные, в нижней - узколанцетные, с заострённой верхушкой, округло-клиновидным основанием и пильчатым краем. Жилкование листа перистосетчатое, с парой развитых боковых жилок, отходящих от средней жилки в нижней части и идущих почти параллельно ей к верхушке листа. Цвет листьев с верхней стороны зелёный, с нижней – светло-зелёный. Листорасположение очередное. Стебель от зелёного до светло-коричневого цвета, цилиндрической формы, с гладкой или слегка ребристой поверхностью и слабо выраженным опушением в верхней части. Корзинки диаметром 5-6 мм, многочисленные, собраны в односторонние, дугообразно изогнутые кистевидно-метёлчатые соцветия. Цветоложе широкое, вогнутое. Обвёртка цилиндрическая, многорядная; её листочки продолговатые, бледновато-зелёные. Срединные цветки трубчатые, золотисто-жёлтые, краевые – ложноязычковые, бледно-жёлтые. Плод – цилиндрическая семянка, 3-4 мм, опушённая, с буроватым хохолком из опадающих щетинок.

7.2. Анатомическое описание травы *Solidago canadensis*

Листовая пластинка. Листья амфистоматические. Адаксиальная эпидерма состоит из изодиаметричных, многоугольной или овальной формы клеток с равномерно утолщенными клеточными стенками (рисунок 32, а). Клетки эпидермы вдоль жилок продольно-удлинённые. Устьичный аппарат аномоцитного типа с 2-3 околоустьичными клетками и замыкающими клетками почковидной формы. Абаксиальная эпидерма представлена изодиаметричными клетками со слабо извилистыми стенками и складчатой

кутикулой (рисунок 32, б). Устьица располагаются в одной плоскости относительно поверхности эпидермы. Устьичный аппарат аномоцитного типа, с 4-8 околоустьичными клетками и почковидными замыкающими клетками.

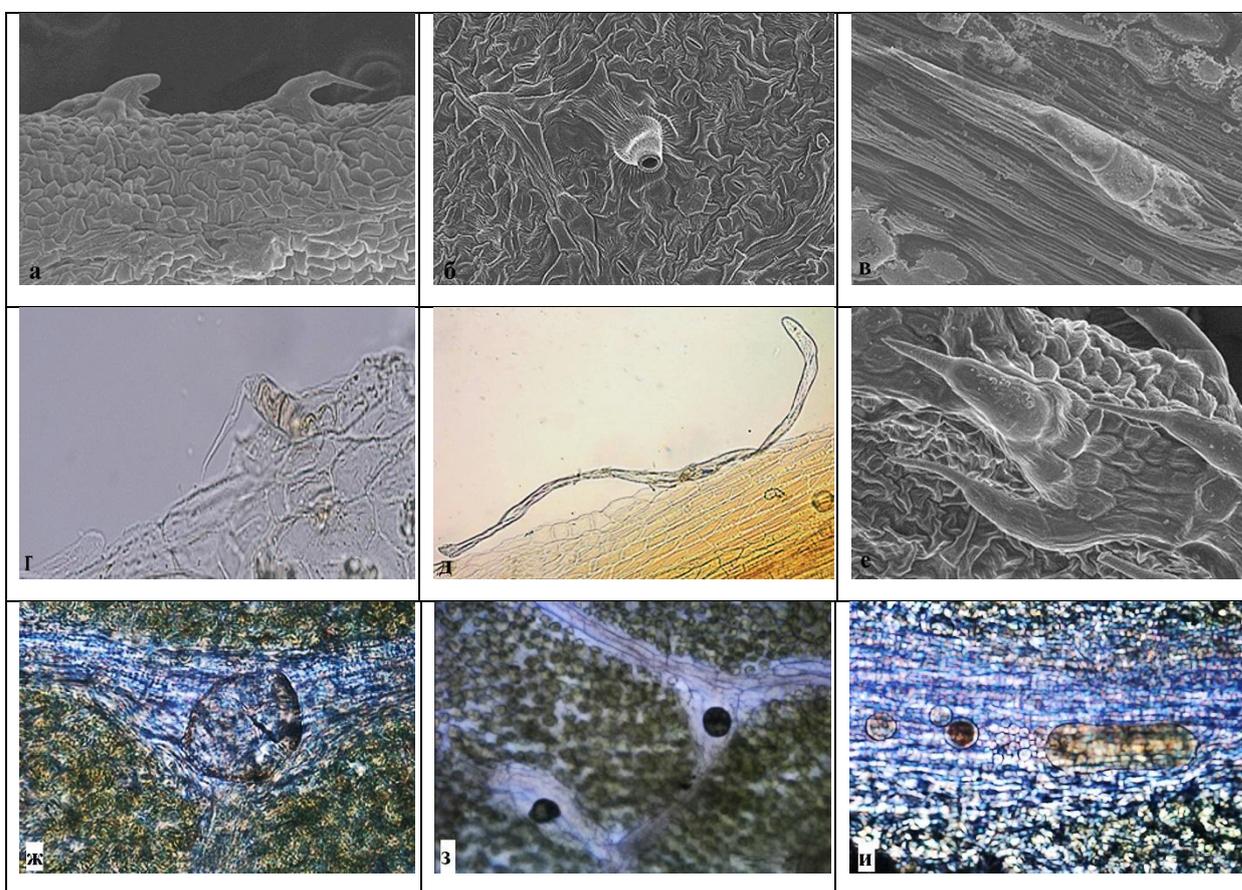
Листья *Solidago canadensis* опушены волосками и покрыты желёзками. С помощью световой и сканирующей электронной микроскопии было обнаружено 4 типа волосков: простые многоклеточные, бичевидные, Т-образные (равноплечие) и щетинистые (краевые).

Простые многоклеточные волоски состоят из 4-5 клеток и локализируются вдоль проводящих жилок с адаксиальной стороны листа (рисунок 32, в). Стенки клеток, находящихся ближе к основанию волоска, утолщены. Бичевидные волоски располагаются по всей поверхности листа. Они состоят из двух частей: основания и апикальной части. Основание представлено 2-3 клетками, немного сужающимися к верхушке, апикальная часть состоит из 2-4 очень суженных и длинных клеток, конечная клетка заострена (рисунок 32, г). Т-образные волоски, характерные для многих представителей семейства *Asteraceae* [40], локализованы на адаксиальной стороне (рисунок 32, д). При приготовлении препарата поперечная клетка часто обламывается и может быть не видна. Краевые щетинистые волоски располагаются как бы в три ряда. Два волоска находятся по бокам края листа, а третий посередине между ними, но сдвинут немного вперёд, в сторону следующей пары. Краевые щетинистые волоски в основном состоят из трёх клеток, конечная клетка заострена. Основные клетки эпидермы, окружающие основания щетинистых волосков, слегка приподняты, и создается впечатление, что они входят в состав волоска, образуя многоклеточное основание (рисунок 32, е).

Встречаются желёзки двух типов: крупные (диаметром до 30 мкм) и мелкие (до 10 мкм). Крупные желёзки имеют овальную форму, погружены в углубления эпидермы и локализованы вдоль жилок листа (рисунок 32, ж). Мелкие желёзки могут встречаться как вдоль жилок, так и на адаксиальной стороне (рисунок 32, з). Часто они содержат коричневатое вещество эфирномасличной природы (рисунок 32, и).

На поперечном срезе листа видно, что лист дорсовентрального типа, с двухрядной палисадой (рисунок 32, к). Клетки эпидермы располагаются в один ряд. Непосредственно над жилками с проводящими пучками клетки верхней эпидермы более мелкие. На нижней стороне листа в районе жилок обнаруживаются основания простых многоклеточных волосков.

В центральной части жилки располагается пучок закрытого коллатерального типа. Проводящая система пучка представлена ксилемой и флоэмой. Между эпидермой и пучком располагаются клетки пластинчатой колленхимы. Остальная часть жилки состоит из крупных тонкостенных паренхимных клеток (рисунок 32, л)



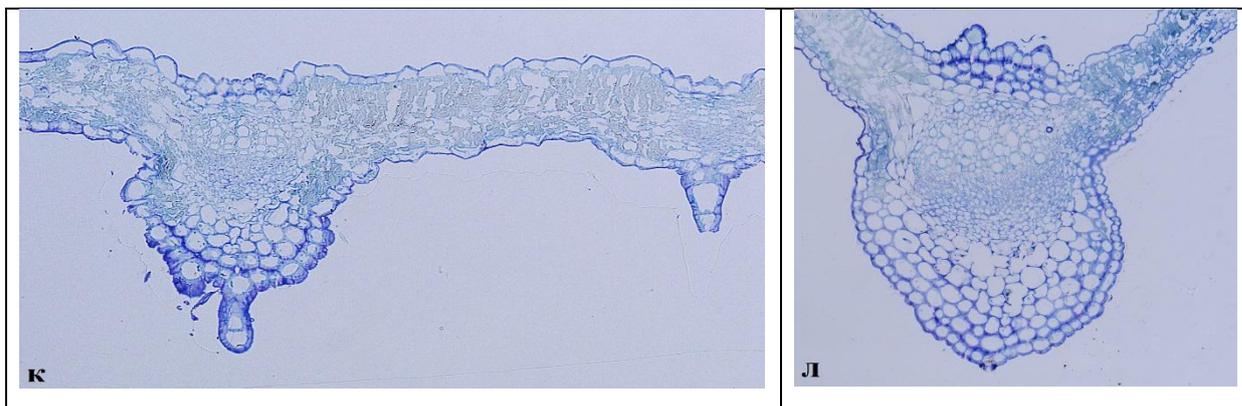


Рисунок 32. Анатомия листа *Solidago canadensis* (а – х250; б – х430; в – х700; г, з – х400; д, к, л – х200; е – х450; ж, и – х1000): а) фрагмент адаксиальной эпидермы (СЭМ); б) фрагмент абаксиальной эпидермы (СЭМ); в) простой многоклеточный волосок (СЭМ); г) бичевидный волосок; д) Т-образный волосок; е) щетинистые волоски (СЭМ); ж) крупная желёзка; з) мелкие желёзки; и) желёзки с бурым эфирномасличным содержимым; к) лист на поперечном срезе; л) центральная жилка листа (поперечный срез).

Стебель. Эпидермальные клетки стебля ориентированы вдоль его длинной оси. Встречаются единичные устьица аномоцитного типа с 3-5 околоустьичными клетками и замыкающими клетками почковидной формы (рисунок 33, а). На поверхности стебля обнаруживаются волоски 2 типов: многоклеточные (из 10 и более клеток) конусовидные волоски (рисунок 33, б) и бичевидные, сходные по строению с бичевидными волосками листа (рисунок 33, в). Также встречаются желёзки диаметром 20-25 мкм (рисунок 33, г), погружённые в эпидерму. Проводящая система представлена сосудами лестничного типа (рисунок 33, д).

На поперечном срезе стебля (рисунок 33, е), сделанном на расстоянии 7-8 см от цветоносной части, чётко выделяется покровная ткань, кора и центральный осевой цилиндр.

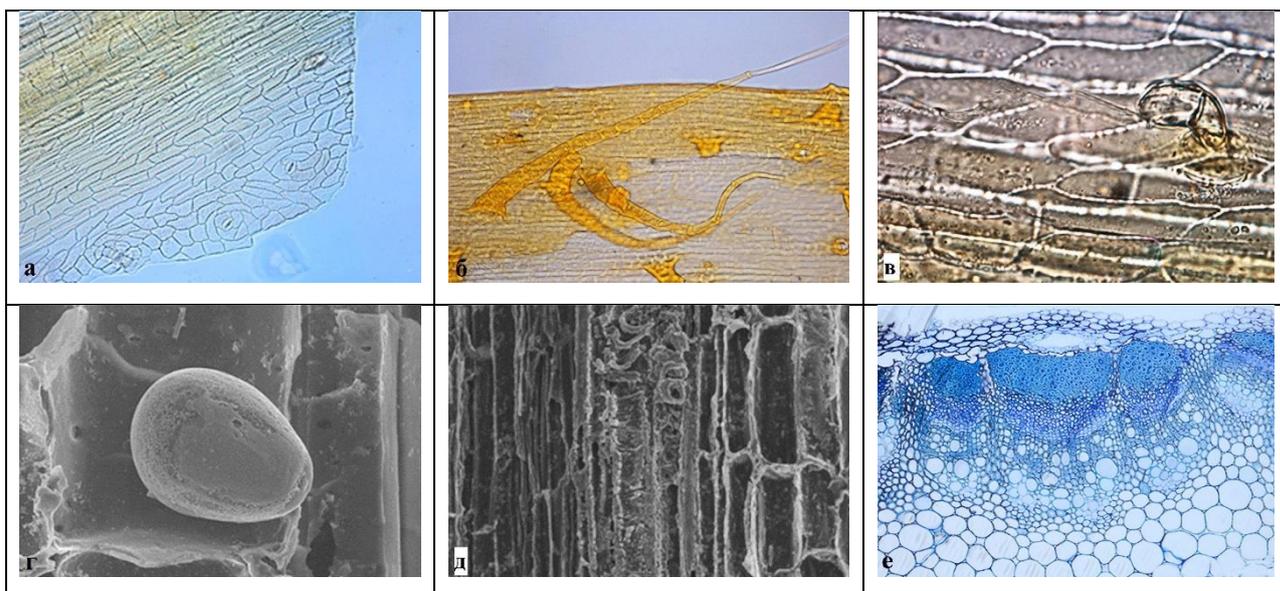


Рисунок 33. Стебель *Solidago canadensis* (а, б, е – $\times 200$; в – $\times 1000$; г – $\times 2000$; д – $\times 550$): а) эпидерма с устьицами; б) многоклеточный конусовидный волосок; в) бичевидный волосок; г) желёзка (СЭМ); д) сосуды лестничного типа (СЭМ); е) поперечный срез.

Эпидерма стебля однорядная. Коровая часть представлена клетками уголковой колленхимы, под которой находится однорядный слой слабо развитой эндодермы. В паренхимном слое клеток коры над эндодермой и наиболее крупными пучками располагаются вместилища схизогенного типа. Выстилающие клетки вместилищ изодиаметричны, располагаются в один ряд.

Центральный цилиндр содержит проводящие пучки коллатерального типа, располагающиеся радиально в один ряд. Более крупные проводящие пучки чередуются с мелкими. В верхней части пучков, а также в зоне вторичной ксилемы между сосудами находятся группы клеток механической ткани. Центральная часть стебля состоит из тонкостенной паренхимы.

Многочисленные цветки собраны в корзинки. Обвёртка корзинки представлена листочками, пронизанными секреторными ходами (рисунок 34, а). Эпидерма листочка обвёртки состоит из тонкостенных паренхимных клеток. Устьица аномоцитного типа, с замыкающими клетками почковидного типа и 3-4 околоустьичными клетками, погружёнными в эпидерму. В терминальной части листочка обнаруживаются бичевидные волоски,

основание которых чаще всего представлено 4 клетками, в отличие от аналогичных волосков листа и стебля (рисунок 34, б).

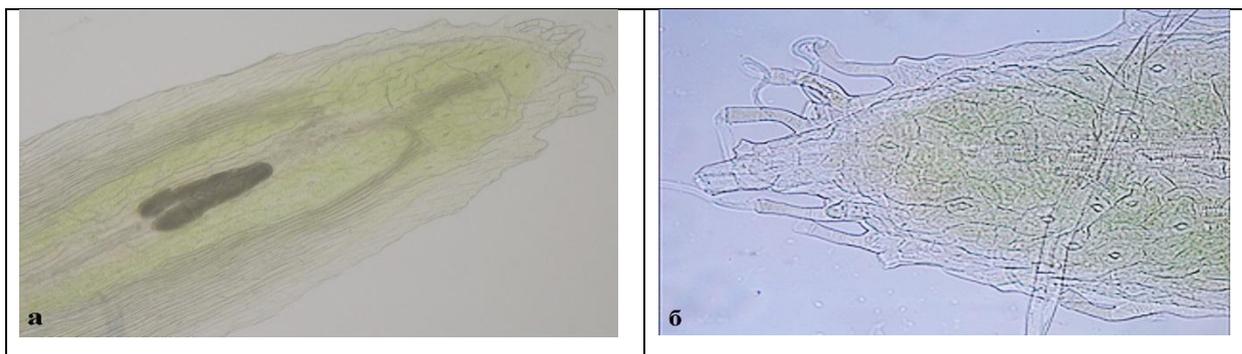
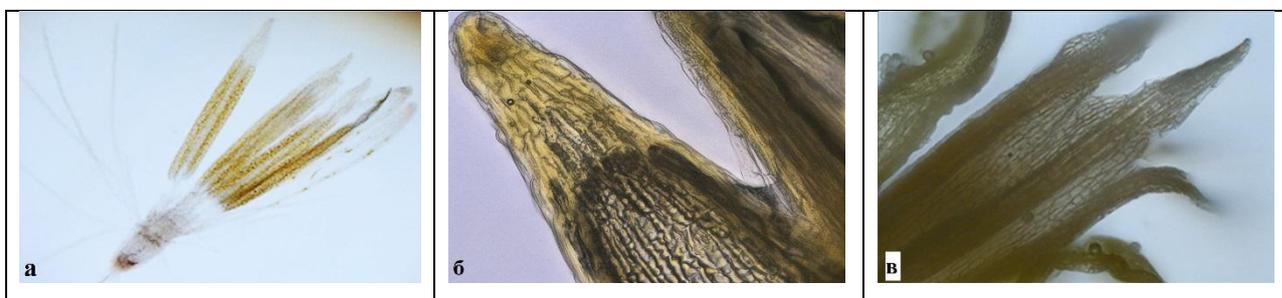


Рисунок 34. Листочек обвёртки *Solidago canadensis* (а – х200; б – х400): а) листочек обвёртки с секреторным ходом; б) терминальная часть обвёртки с бичевидными волосками и устьицами.

Трубчатые цветки (рисунок 35, а) занимают центральную часть соцветия и имеют пятичленные венчик и андроцей. Клетки венчика многоугольной формы, без видимых включений (рисунок 35, б). Тычинки нижними частями прикреплены к венчику. Тычиночные нити свободные, пыльники срастаются, образуя трубку (рисунок 35, в). Клетки трубки изодиаметричные, клеточные стенки равномерно утолщены (рисунок 35, г, д). Устьиц, волосков и вместилищ не обнаружено. Пыльца многочисленная, шиповатая, локализована внутри пыльцевой трубки (рисунок 35, е, ж). Гинецей из одного пестика (рисунок 35, з), удлинённый столбик которого состоит из полигональных клеток. На поверхности рыльца локализованы сосочковидные клетки эпидермы (рисунок 35, и).



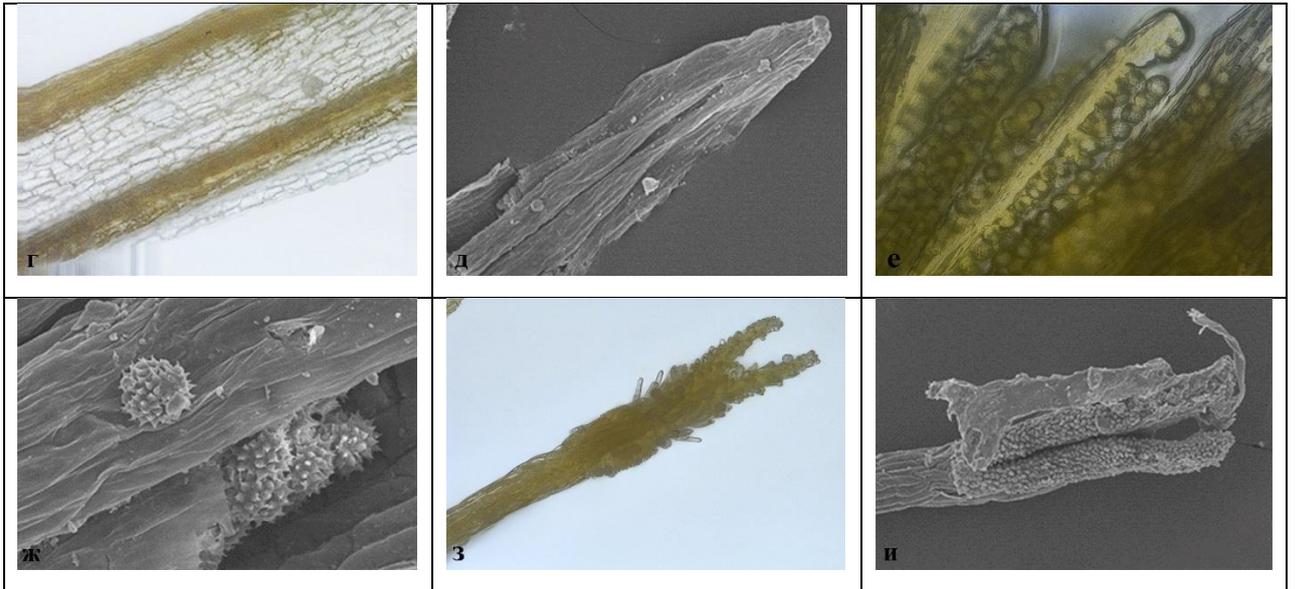


Рисунок 35. Трубочатый цветок *Solidago canadensis* (а – х50; б, г, е, з – х400; в – х200; д – х250; ж – х1400; и – х330): а) общий вид; б) фрагмент венчика; в) фрагмент пыльцевой трубки; г) клетки эпидермы пыльцевой трубки; д) тычинка (СЭМ); е) пыльца в пыльнике; ж) общий вид пыльцы (СЭМ); з) фрагмент гинецея – рыльце со столбиком; и) рыльце (СЭМ).

Ложноязычковые цветки (рисунок 36, а) занимают в соцветии краевое положение. Венчик представлен тремя сросшимися лепестками, расходящимися лишь в терминальной части. Клетки венчика овальной формы, располагаются в 2-3 ряда. В терминальной части лепестков обнаруживаются клетки с многочисленными золотисто-жёлтыми каплями, содержащими, предположительно, эфирное масло (рисунок 36, б).

Гинецей представлен одним пестиком с сомкнутыми лопастями рыльца и коротким столбиком, прирастающим основанием к венчику (рисунок 36, в). Поверхность клеток эпидермы рыльца складчатая. В терминальной части рыльца находятся папиллы (рисунок 36, г). Желёзки выступают над поверхностью эпидермы (рисунок 36, д).

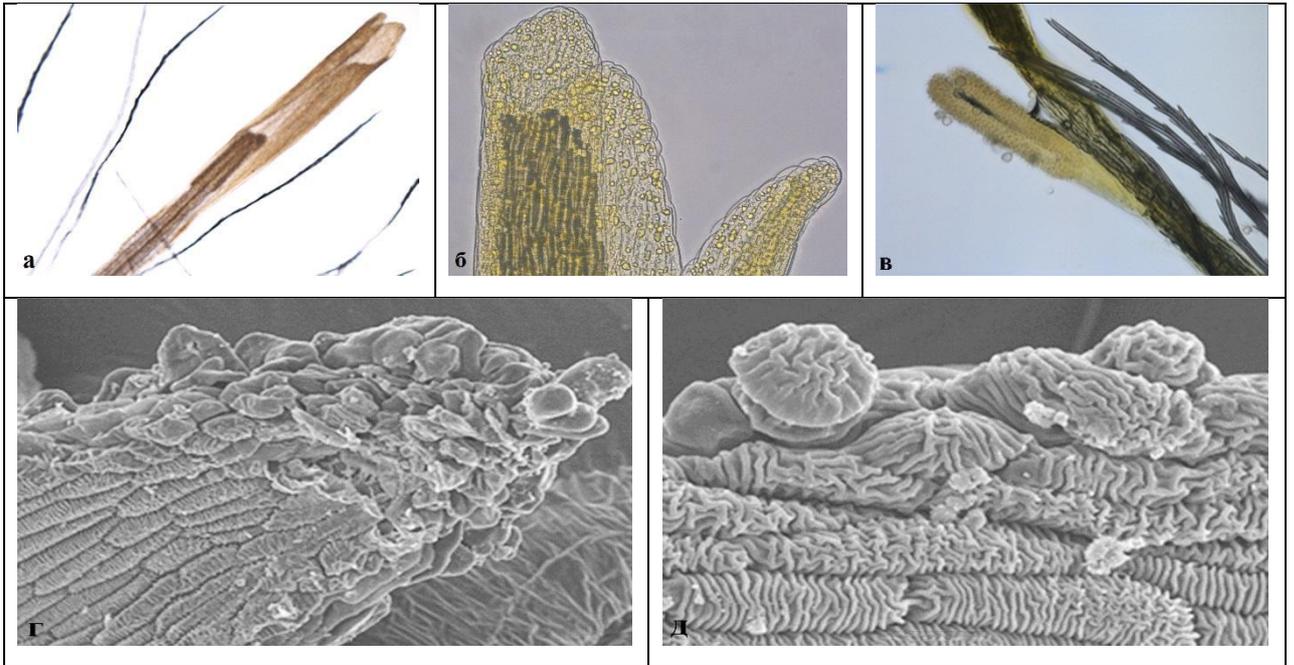


Рисунок 36. Ложноязычковый цветок *Solidago canadensis* (а – х100; б – х400; в – х200; г – х700; д – х1900): а) общий вид; б) терминальная часть венчика; в) фрагмент гинецея – рыльце со столбиком; г) терминальная часть рыльца (СЭМ); д) часть рыльца с желёзками (СЭМ).

Семянки цилиндрические, туповато-ребристые, среднеопушённые (рисунок 37, а). Хохолок состоит из многоклеточных трёхрядных волосков, расположенных в один круг (рисунок 37, б). На поверхности семянки обнаружены сдвоенные волоски, типичные для сложноцветных [4]. Клетки волосков плотно сомкнуты, с заостренными концами (рисунок 37, в). Железистых трихом не было обнаружено.



Рисунок 37. Семянки *Solidago canadensis* (а – х180; б – х200; в – х1000): а) общий вид (СЭМ); б) фрагменты трихом хохолка; в) сдвоенный волосок.

Выводы к главе 7:

1. В процессе исследования гербарных образцов цветоносных побегов *Solidago canadensis* с использованием светового и сканирующего микроскопов были значительно расширены и дополнены особенности морфологического и анатомического строения листьев, стеблей, листочков обвёртки, цветков и семянков этого вида.

2. Были подтверждены ранее описанные в литературе [27,33] анатомические признаки этого вида: устьица аномоцитного типа в эпидерме листьев, стеблей и листочков обвёртки, наличие простых многоклеточных волосков и эфирномасличных структур – желёзок.

3. Впервые установлено наличие Т-образных волосков у листьев, бичевидных волосков у листьев, стеблей и листочков обвёртки, наличие вместилищ схизогенного типа над крупными пучками стебля, папилл и желёзок на эпидерме гинцея ложноязычкового цветка. Конкретизирована природа краевых волосков листа и волосков семянков.

4. Результаты проведённых исследований позволяют рекомендовать ввести в проект ФС «Золотарника канадского трава – *Solidaginis canadensis herba*» дополнительные морфологические и анатомические данные по строению листьев, стеблей, листочков обвёртки, цветков и семянков для идентификации сырья.

Глава 8. СРАВНИТЕЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ДИУРЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА *SOLIDAGO CANADENSIS* И ОТДЕЛЬНЫХ ЕГО КОМПОНЕНТОВ. КОМПЬЮТЕРНЫЙ ПРОГНОЗ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ВЫДЕЛЕННЫХ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ

В ранее описанных главах отражены литературные данные о преобладании в химическом составе травы *Solidago canadensis* фенольных соединений и флавоноидов [3,76,86], использовании экстрактов из данного вида сырья в качестве диуретического, нефролитического и спазмолитического средства [21,25], наличия на фармацевтическом рынке ряда комплексных препаратов, таких как «Марелин», «Простанорм» и «Фитолизин» [28,35] и применении их при лечении и профилактике фосфатного и оксалатного нефроуролитиаза, хронического простатита, аденомы простаты, мочекаменной болезни, цистита, уретрита и уретрального синдрома [23], а также данные фармакопейной статьи ФС 42-2777-91 «Трава золотарника канадского», согласно которой стандартизация флавоноидов в траве золотарника канадского осуществляется по рутину [33]. Однако работа А.Ganeshpurkar и его соавторов содержит ряд исследований, показывающих влияние рутина на желудочно-кишечный тракт, центральную нервную, сердечно-сосудистую, эндокринную и дыхательную системы, в которых не упоминается о диуретическом эффекте данного соединения [62]. Для объяснения данного феномена был проведён сравнительный эксперимент по исследованию активности суммарного экстракта *Solidago canadensis* и его двух основных компонентов: рутина и кверцетина.

8.1. Сравнительное исследование диуретической активности экстракта *Solidago canadensis* и отдельных его компонентов

Для эксперимента был получен экстракт из травы *Solidago canadensis* по технологии, описанной в главе 2.2.2. Экстракт был высушен в эксикаторе при

температуре 40 градусов и перерастворён в воде с диметилсульфоксидом. В качестве сравнения использовались стандартные водные растворы рутина и кверцетина.

Эксперимент по определению диуретической активности проводился на белых крысах-самцах массой 350-400 г. Животные были разделены на 4 группы. Первая группа была контрольной и в качестве диуретической нагрузки получала внутривенно через зонд 10 мл воды на каждое животное. Группа опытных животных получала тем же способом аналогичный объём водного раствора экстракта золотарника из расчёта 500 мг/кг массы животного, а группы сравнения – аналогичные объёмы водных растворов рутина и кверцетина в дозах 40 мг/кг и 20 мг/кг соответственно. После введения веществ и водной нагрузки крыс помещали в метаболические камеры с мочеприёмником. В ходе опыта ежедневно проводилось наблюдение за диурезом с фиксацией объёма выделенной мочи от каждого животного. Мочу собирали в пластиковые контейнеры на протяжении 6 часов от введения веществ (таблица 1). Во время проведения эксперимента крысы были лишены доступа к воде и пище.

Таблица 29. Определение диуретической активности суммарного экстракта *Solidago canadensis*

Введённый препарат	Объём уринации, мл						
	1 час	2 час	3 час	4 час	5 час	6 час	Сумма
Контроль (вода)	2,44±0,87	1,86±0,68	1,26±0,23	0,66±0,52	1,04±0,53	0,84±0,40	8,1±0,54
Жидкий экстракт золотарника	1,28±0,66	1,36±0,33	1,8±0,41	2,32±0,32	1,6±0,37	0,98±0,24	9,34±0,39
Рутин	2,14±0,43	1,88±0,39	1,4±0,19	1,14±0,38	1,14±0,72	0,8±0,71	8,5±0,47
Кверцетин	1,9±0,25	1,74±0,32	1,5±0,26	1,06±0,37	0,88±0,62	0,74±0,36	7,82±0,36

Длительность проводимого эксперимента была обоснована достигнутым уровнем уринации, сравнимым с объёмом первоначально введённых растворов и воды. Полученные данные отражены на рисунке 38.

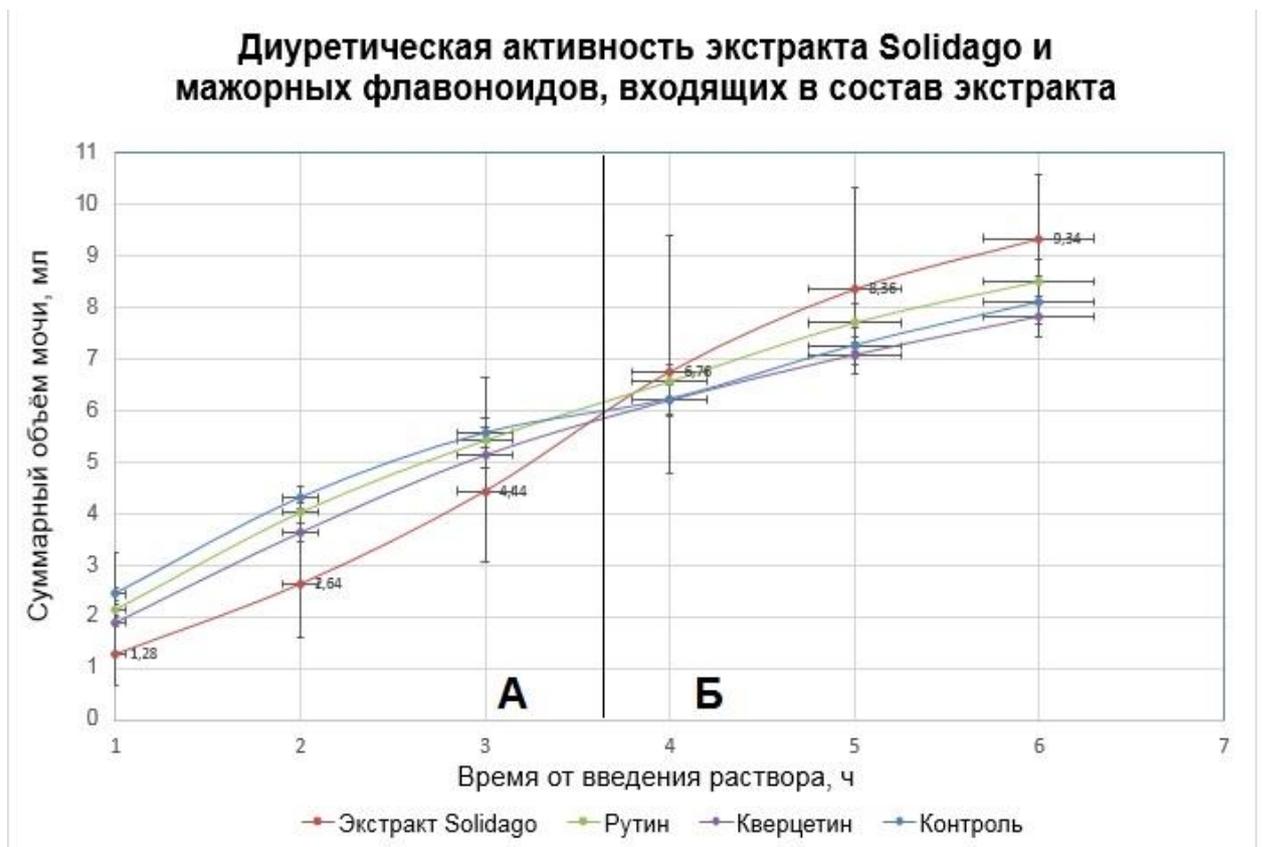


Рисунок 38. График диуретической активности экстракта *Solidago canadensis*, рутина и кверцетина

Примечание: зона А – предполагаемый спазмолитический эффект; зона Б – диуретический эффект

На представленном графике видно, что в течение первых трёх часов с момента начала эксперимента диурез крыс, получивших водный раствор экстракта *Solidago canadensis* ниже в сравнении с диурезом контрольной группы и групп сравнения, что объясняется преобладанием возможного спазмолитического эффекта экстракта. После третьего часа наблюдается сдвиг кривой экстракта в сторону увеличения уринации и диуретического эффекта. Таким образом, можно говорить о наличии двух зон: зоны спазмолитического (А) и зоны диуретического (В) эффектов.

Однако следует отметить, что диуретический эффект водного экстракта *Solidago canadensis* напрямую не связан с входящими в его состав мажорными компонентами (рутин и кверцетин), а опосредован другими входящими в его состав действующими веществами.

Известно, что спазмолитические средства широко используют для предупреждения и купирования спазмов гладкой мускулатуры органов желудочно-кишечного тракта и мочевыводящих путей [64,71]. Спазмолитики также применяют для устранения приступа почечной колики, отхождения мелких конкрементов и уменьшения отека тканей при длительном стоянии конкремента [77]. В случае растительных препаратов (в частности, фитолизина) спазмолитический эффект возникает вследствие действия флавоноидной составляющей препарата [12]. Купируя спазм, растительные компоненты со спазмолитическим действием способны нормализовать функционирование органов, имеющих гладкую мускулатуру, а также восстановить уро- и гемодинамику мочевыводящих путей.

В состав препарата «Фитолизин» входят экстракты корневищ пырея, луковиц лука репчатого, листьев березы, плодов петрушки, золотарника, корней любистока, травы хвоща полевого, травы горца птичьего, масло шалфея, хвои сосны, мяты перечной и апельсиновое масло [18]. Препарат обладает мочегонным, спазмолитическим, противомикробным и противовоспалительным эффектами, способствуя выведению мелких конкрементов. Применение «Фитолизина» при состояниях, связанных с почечной коликой, обосновано наличием спазмолитического эффекта, при котором устраняется спазм, вследствие чего мочевой пузырь может растягиваться и за счёт этого будет увеличиваться кумулятивный объём мочи.

В работе Л. Савченко с соавторами также описывается эксперимент по определению диуретической активности экстракта *Solidago canadensis*, однако в качестве препарата сравнения используется широко известный на фармацевтическом рынке петлевой диуретик фуросемид, для которого не характерно наличие спазмолитической активности [22]. Полученные авторами данные показывают, что жидкий экстракт *Solidago canadensis* оказывает влияние на диурез уже в первый час после введения и действует равномерно в течение 4-х часов, достигая пика уринации к третьему часу, однако диуретический эффект экстракта *Solidago canadensis* выражен значительно

мягче, чем у фуросемида. Это объясняется кратковременным и дозозависимым эффектом фуросемида на всём протяжении толстого сегмента восходящего колена петли Генле и его влиянием на ренин-ангиотензиновую систему [91]. Однако при наличии конкрементов в почках или мочевыводящих путях применение фуросемида может быть опасно ввиду повышения внутрипочечного давления вплоть до закупорки сосуда с возможным развитием инфаркта почки.

8.2. Компьютерный прогноз фармакологической активности выделенных индивидуальных веществ

Прогнозирование спектра фармакологической активности субстанций и веществ является существенным этапом при подборе, а также создании новых лекарственных препаратов. Компьютерный прогноз спектра фармакологической активности позволяет определить наиболее перспективные направления для тестирования фармакологического действия конкретных веществ и отсеять потенциально опасные молекулы ещё на ранних стадиях [38].

Существующая на сегодняшний день компьютерная программа PASS разработана для прогнозирования спектра фармакологической активности вещества по его структурной формуле на основе анализа зависимостей «структура-активность» [20]. Входные данные для исследования представляются в виде структурных формул соединений в форматах MOL или SDF. Конечным результатом является информация, представленная в форме перечня вероятных видов активности с двумя параметрами - P_a и P_i , характеризующими вероятности наличия и отсутствия фармакологического действия у рассматриваемого соединения соответственно [81].

Принимая во внимание литературные данные об использовании экстракта *Solidago canadensis* и соединений, входящих в его состав, в качестве диуретических, противовоспалительных, противомикробных и

спазмолитических средств, было решено оценить фармакологический потенциал каждого выделенного из экстракта *Solidago canadensis* индивидуального соединения. Компьютерный прогноз фармакологической активности рутина, кверцетина, нарциссина и кверцетин-3-О-бета-D-6''-ацетилглюкопиранозида был определён методом *in silico* с помощью программы PASS версии 2020 (Refined). Общее количество различных видов активности, прогнозируемых для указанных соединений, представлено на рисунке 39.

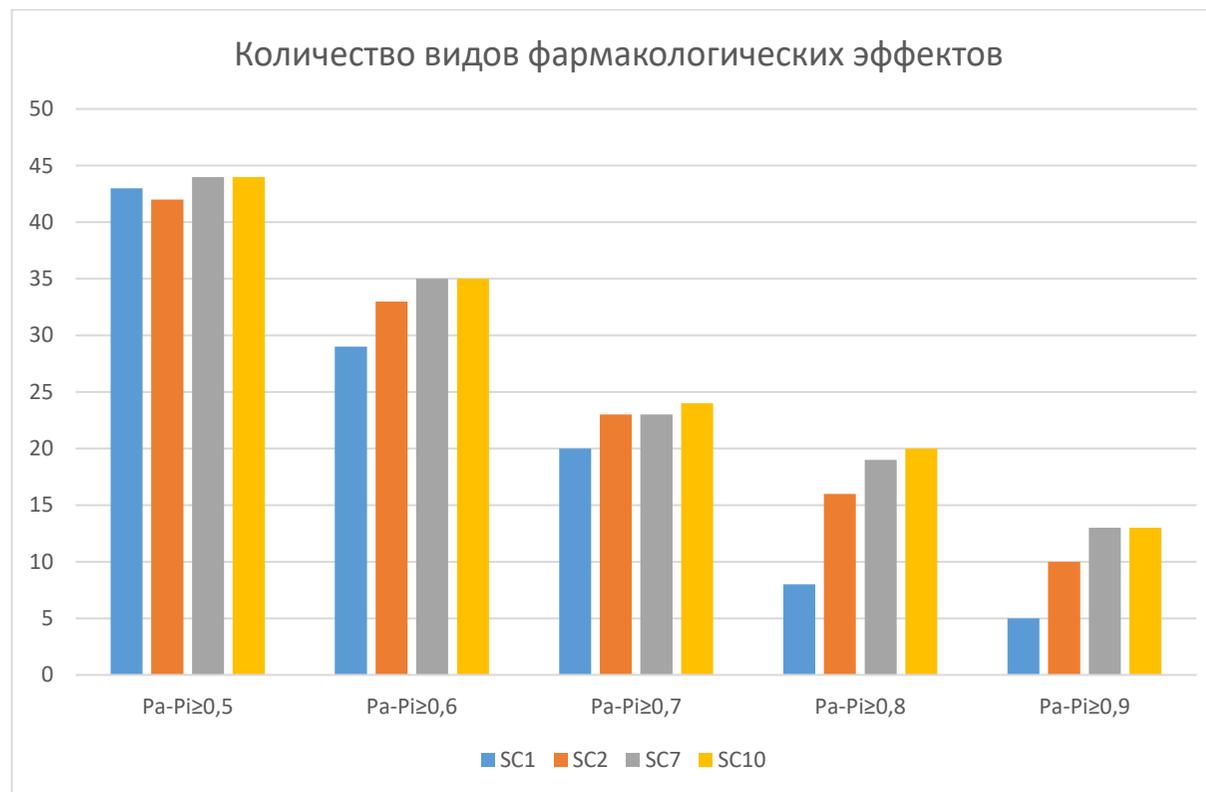


Рисунок 39. Общее количество видов фармакологической активности, предсказанных при различных пороговых значениях Pa-Pi для соединений, выделенных из экстракта *Solidago canadensis*

Примечание: ось абсцисс – значения вероятности проявления фармакологических активностей, Pa-Pi; ось ординат – число видов фармакологической активности, предсказанных для данных соединений.

Из представленных на рисунке 39 данных видно, что при пороговых значениях вероятности $P_a-P_i \geq 0,7$ для кверцетина прогнозируется 20 фармакологических эффектов, для кверцетин-3-О-бета-D-6''-ацетилглюкопиранозид и рутина – 23, для нарциссина – 24. При повышении пороговых значений вероятности до значений $P_a-P_i \geq 0,8$ и $P_a-P_i \geq 0,9$ число прогнозируемых видов активности снижается для каждого из анализируемых соединений.

Информация обо всех конкретных видах биологической активности, предсказанных для соединений SC1, SC2, SC7, SC10 при порогах от 0,5 до 0,9 с шагом в 0,1 приведена в таблице 30. В ячейках таблицы указаны величины P_a-P_i для наиболее характерных видов активностей, вероятность которых превышает пороговые значения. Прочерк означает, что конкретный вид активности для анализируемого соединения отсутствует при рассматриваемом пороговом значении или отсутствует вовсе.

Таблица 30. Виды фармакологической активности, предсказанные для соединений *Solidago canadensis* с оценкой вероятности P_a-P_i

Прогнозируемые виды биологической активности	Вероятность наличия биологической активности (P_a-P_i)			
	SC1 (кверцетин)	SC2 (кверцетин-3-О-бета-D-6''-ацетилглюкопиранозид)	SC7 (рутин)	SC10 (нарциссин)
Антимутагенная	0,958	-	0,989	0,991
Ингибитор цистатионин- β -синтазы	0,936	-	0,879	-
Ингибитор арахидонат-5-липоксигеназы	0,935	-	-	0,856

Захват свободных радикалов	0,918	0,880	0,900	0,883
Антиоксидантная	0,916	0,919	0,941	0,921
Гипогликемическая	0,711	0,984	0,990	0,990
Ингибитор альфа-глюкозидазы	0,816	0,971	0,986	0,991
Хемопревентивная	0,739	0,961	0,969	0,980
Ингибитор пероксидазы липидов	0,730	0,971	0,967	0,974
Ингибитор амилазы	0,741	0,966	0,965	0,970
Радиопротекторная	0,812	0,914	0,964	0,968
Лечение пролиферативных заболеваний	0,664	0,955	0,956	0,958
Антигипоксанта	0,699	0,940	0,948	0,940
Антигемморагическая	0,634	0,768	0,938	0,913
Антигиперхолестеринемическая	-	0,930	0,925	0,922
Кардиопротекторная	0,809	0,842	0,880	0,863
Спазмолитическая	0,608	0,858	0,883	0,897
Антигипотензивная	-	0,613	0,875	0,881
Противовоспалительная	0,754	0,856	0,858	0,832
Антидиабетическая	-	0,792	0,811	0,755

Вазодилататор	0,529	0,854	0,557	0,900
Цитостатическая	0,652	0,827	-	0,828
Антагонист интерлейкина-4	0,796	-	0,576	0,536
Ингибитор агрегации бета-амилоида	0,788	0,654	0,620	0,621
Ингибитор липооксигеназы	0,765	-	-	-
Ингибитор высвобождения гистамина	0,750	0,676	0,672	0,626
Антинеопластическая	0,650	0,601	0,616	0,611
Хемопротективная	0,740	0,697	0,681	0,655
Антигипертриглицеридемическая	0,739	0,764	0,786	0,755
Ингибитор MAO A	0,700	-	-	-
Ингибитор 3-гликопротеина	0,630	-	-	-
Лечение рака простаты	0,622	-	-	-
Антипротозойная	0,603	0,581	0,573	0,560
Антагонист апоптоза	0,586	0,679	0,711	0,686
Лечение заболеваний костей	0,582	-	-	-

Ингибитор высвобождения 5-гидрокситриптамина	0,580	-	-	-
Ингибитор топоизомеразы-II	0,570	-	-	0,503
Лечение сосудистых заболеваний	0,569	0,715	0,733	0,703
Лечение заболеваний печени	0,568	0,645	0,697	0,661
Антисептик	0,549		-	-
Стимулятор захвата 5-гидрокситриптамина	0,544	0,564	-	-
Ингибитор меланина	0,539	0,600	0,593	0,568
Ингибитор высвобождения фактора некроза опухоли	0,540	0,595	0,651	0,662
Лечение гастрита	0,529	-	-	-
Антагонист бета-рецепторов экстрогена	0,517	-	-	-
Антилейкимическая	0,514	0,536	0,551	-
Антагонист эстрогена	0,496	-	0,523	-
Жаропонижающая	-	0,793	0,787	0,508
Антибактериальная	-	0,768	-	0,799

Респираторный аналептик	-	0,764	0,660	0,627
Иммуностимулирующая	-	0,669	0,663	0,634
Антипаразитарическая	-	0,618	0,673	0,648
Ингибитор альдегиддегидрогеназы	-	0,586	-	-
Ингибитор алкогольдегидрогеназы	-	-	0,593	-
Антагонист холестерина	-	0,589		-
Противогрибковая	-	0,553	0,600	0,579
Отхаркивающая	-	0,540	0,555	0,569
Антиишемическая	-	0,540	-	-
Лечение психосексуальной дисфункции	-	-	0,638	0,620
Антигельминтная	-	-	0,628	0,580
Лечение болезни Альцгеймера	-	-	0,595	0,571

Полученные результаты подтверждают рассмотренные ранее литературные данные о широком спектре фармакологических эффектов, присущих вторичным метаболитам *Solidago canadensis*. Среди предсказанных эффектов обращают на себя внимание спазмолитический, вазодилататорный, антиоксидантный и кардиопротекторный.

Полученные результаты позволяют сделать предположение, что спазмолитическая и вазодилататорная активности обусловлены содержанием в экстракте *Solidago canadensis* кверцетин-3-О-бета-D-6''-ацетилглюкопиранозида и нарциссина, а антиоксидантная и кардиопротекторная активности – рутином и кверцетином.

Помимо этого, некоторые виды активностей, предсказанные с высокой вероятностью и не описанные в литературе применительно к экстракту *Solidago canadensis* (антимутагенная, гипогликемическая), могут послужить основой для дальнейшего изучения выделенных соединений в качестве потенциальных фармакологических субстанций с указанными свойствами.

При планировании экспериментальных исследований рекомендуется анализировать прогнозируемые виды биологической активности последовательно, от наиболее вероятных эффектов к менее вероятным [51].

Выводы к главе 8:

1. В результате эксперимента *in vivo* предполагается наличие спазмолитического эффекта, проявляющегося в первые часы после введения внутрижелудочно жидкого экстракта *Solidago canadensis*. После третьего часа наблюдался сдвиг кривой экстракта в сторону увеличения уринации и проявления диуретического эффекта. Наличие предполагаемого спазмолитического эффекта позволяет использовать экстракт из травы *Solidago canadensis* при почечных коликах и нефролитиазе, т.к. при его реализации достигается расслабление гладкой мускулатуры, что способствует облегчению выведения камней из почек и мочеточников.

2. Диуретический эффект водного экстракта *Solidago canadensis* напрямую не связан с входящими в его состав мажорными компонентами (рутин и кверцетин), а опосредован другими входящими в его состав действующими веществами.

3. В результате проведённого компьютерного прогноза фармакологической активности выделенных из травы *Solidago canadensis* вторичных метаболитов с помощью программы PASS был установлен широкий спектр фармакологических эффектов, среди которых спазмолитический, вазодилататорный, антиоксидантный и кардиопротекторный являются известными для экстракта *Solidago canadensis*. Гипогликемическая и антимуtagenная активности, прогнозируемые с высокой долей вероятности для выделенных индивидуальных соединений и ранее не описанных в литературе применительно к экстракту *Solidago canadensis*, могут стать основой для их последующего изучения в качестве потенциальных лекарственных кандидатов для лечения сахарного диабета.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенного исследования сформулированы следующие выводы:

1. Анализ литературных данных по химическому составу *Solidago canadensis* позволил установить мажорные группы соединений в растении и разработать методику выделения индивидуальных веществ. При изучении распределения химического состава отмечено преобладание фенольных соединений в траве *Solidago canadensis*, а терпеноидов – в цветках и корнях.

2. Методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии из травы *Solidago canadensis* было выделено 4 индивидуальных вещества: кверцетин, кверцетин-3-О-β-D-6''-ацетилглюкопиранозид, рутин и нарциссин. Химическая структура соединений была установлена с помощью ВЭЖХ-МС, масс-спектрометрии и ЯМР-спектроскопии.

3. Уточнена и валидирована методика количественного определения флавоноидов в траве *Solidago canadensis*, основанная на спектрофотометрии по реакции комплекса флавоноидов с алюминия хлоридом 2%. Определены технологические параметры и условия, позволяющие достичь наибольшего выхода данной группы веществ и конкретизировать требования по заготовке сырья *Solidaginis canadensis herba*.

4. Актуализированы требования к качеству сырья *Solidaginis canadensis herba* – уточнены микроскопические диагностические признаки сырья. Впервые были обнаружены и описаны Т-образные волоски у листьев, бичевидные волоски у листьев, стеблей и листочков обвёртки. Конкретизировано строение краевых волосков листа и волосков семянков, вместилищ схизогенного типа над крупными пучками стебля, папилл и желёзок на эпидерме гинцея ложноязычкового цветка.

5. При изучении диуретической активности экстракта *Solidago canadensis* и его отдельных компонентов *in vivo* было определено, что

увеличение уринации происходит через 3 часа с момента внутрижелудочного введения экстракта. Установлено, что диуретический эффект экстракта *Solidago canadensis* напрямую не связан с входящими в его состав мажорными компонентами (рутин и кверцетин), а опосредован другими действующими веществами.

При прогнозировании вероятного спектра фармакологической активности выделенных из травы *Solidago canadensis* индивидуальных веществ *in silico* установлено наличие как известных фармакологических эффектов, так и ранее не описанных в литературе применительно к экстракту *Solidago canadensis*, что даёт основу для дальнейшего изучения данного растения в качестве источника потенциальных лекарственных кандидатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрамова, Л.М. Золотарник канадский *Solidago canadensis* L. в Абхазии / Л.М. Абрамова, Л.Г. Гергия, А.Н. Мустафина, Э.А. Айба, Я.М. Голованов // Наука юга России. – 2020. – Том 16, №4. – С. 51-62. DOI: 10.7868/S25000640200406
2. Батюк, В.С. Флавоноиды *Solidago canadensis* и *Solidago virgaurea* / В.С. Батюк, С.Н. Ковалева // Химия природных соединений. – 1985. – №4. С. 566-567.
3. Батюк, В.С. Флавоноиды *Solidago virgaurea* L. и *Solidago canadensis* L. и их фармакологические свойства / В.С. Батюк, Е.А. Васильченко, С.Н. Ковалёва // Растительные ресурсы. – 1988. – №1. – С. 92-99.
4. Бойко, Э.В. Трихомы семян видов Asteraceae. I. Кроющие волоски / Э.В. Бойко // Turczaninowia. – 2011. – Том 14, №1. – С. 130-144.
5. Государственная фармакопея Российской Федерации [Электронный ресурс] / МЗ РФ. – М., 2018. – [Электронный ресурс]. – URL: <http://femb.ru> (дата обращения 21.08.2020).
6. Гусев, А.П. Воздействие инвазии золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) на восстановительную сукцессию на залежах (юго-восток Беларуси) / А.П. Гусев // Российский журнал биологических инвазий. – 2015. Том 8, №1. – С. 10-16.
7. Дворецкий, И.Х. Латинско-русский словарь / И.Х. Дворецкий. – 2 изд. – М.: Русский язык, 1976. – 1096 с.
8. Капсаргин, Ф.П. Роль растительных препаратов в литокинетической терапии и метафилактике мочекаменной болезни / Ф.П. Капсаргин, В.С. Саенко, В.М. Трояков, И.В. Буторова, Д.Г. Голубева, Л.Ф. Зуева, Н.С. Тихомиров, Е.Ю. Хлебнова // Экспериментальная и клиническая урология. – 2021. – Том 14, №2. – С. 92-99.
9. Карпова, В.И. Флора Республики Беларусь: медицинское и хозяйственное значение: [в 3-х т.]. Т.2 / В.И. Карпова, Н.С. Гурина, Г.Н. Бузук,

М.М. Коноплёва, Л.А. Любаковская, Н.А. Кузьмичёва, Н.П. Кузнецова, Ю.О. Ловчиновский. – Витебск: ВГМУ, 2005. – 603 с.

10. Клышев, Л.К. Флавоноиды растений / Л.К. Клышев, В.А. Бандюкова, Л.С. Алюкина – Алма-Ата: Наука, 1978. – 220 с.

11. Ковалев, В.Н. Практикум по фармакогнозии: учебное пособие для студентов ВУЗов / В.Н. Ковалев, Н.В. Попова, В.С. Кисличенко, Т.И. Исакова, И.А. Журавель, С.И. Степанова, А.Г. Сербин, Л.М. Серая, Л.С. Картмазова; под ред. В.Н. Ковалёва. – Харьков: Золотые страницы, 2003. – 512 с.

12. Коздоба, А.С. Спазмолитическая терапия мочекаменной болезни / А.С. Коздоба // Русский медицинский журнал. – 2012. – Том 20, №18. С. 898-903

13. Лужанин, В.Г. Выделение индивидуальных соединений из надземной части стальника полевого (*Ononis arvensis* L.) и золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) / В.Г. Лужанин, А.К. Уэйли, А.О. Понкратова, Е.А. Гришукова, И.С. Сулоев, С.Н. Смирнов, Е.Б. Серебряков // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. – Том 10, №1. – С. 83–89. DOI: [10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89](https://doi.org/10.33380/2305-2066-2021-10-1-83-89).

14. Лунева, Н.Н. Золотарник канадский – следующий? / Н.Н. Лунева, С.Ю. Ларина // Защита и карантин растений. – 2015. – №1. – С. 17-18.

15. Марченко, Ю.О. Роль фармацевтических рынков в современной структуре мирового хозяйства / Ю.О. Марченко // Вестник университета. – 2015. – №12. – С. 93-96.

16. Моисеев, Д.С. Идентификация флавоноидов в растениях методом ВЭЖХ / Д.С. Моисеев, Г.Н. Бузук, В.Л. Шелото // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Том 45, №1. – С. 35-38.

17. Найда, Н.М. Урожайность и качество сырья золотарника канадского в условиях Ленинградской области / Н.М. Найда, М.А. Ефремова, К.Ю. Поленикова // Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. – 2017. – Том 48 – С. 24-30.

18. Описание лекарственного препарата «Фитолизин» [Электронный ресурс] Справочник лекарственных средств «Видаль». – 2019. Дата обновления: 28.11.2018. – URL: https://www.vidal.ru/drugs/phytolysin_38065 (дата обращения: 05.12.2021)

19. Пещанская, Е.В. История изучения и распространение видов рода *Solidago* флоры Кавказа. / Е.В. Пещанская, Н.Г. Лиховид // Наука. Инновации. Технологии. – 2017. – №4. – С. 177-184.

20. Поройков, В.В. Компьютерное конструирование лекарств: от поиска новых фармакологических веществ до системной фармакологии / В.В. Поройков // Биомедицинская химия. – 2020. – Том 66, №1. – С. 30-41. DOI: 10.18097/PBMC20206601030

21. Савустьяненко, А.В. Применение экстрактов золотарника обыкновенного (*Solidago virgaurea* L.) для лечения заболеваний мочевыводящих путей / А.В. Савустьяненко // Почки. – 2014. – Том 9, №3 – С. 29-37.

22. Савченко, Л.Н. Получение экстракционного препарата противовоспалительного и мочегонного действия из травы золотарника канадского / Л.Н. Савченко, Т.Ф. Маринина, В.А. Карпенко // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2016. – Том 18, №2. – С. 195-198.

23. Саенко, В.С. Опыт применения препарата «Фитолизин» в комплексной терапии инфекций мочевых путей и метафилактике нефролитиаза / В.С. Саенко, Ф.П. Капсаргин, С.В. Песегов, В.М. Трояков // Урология. – 2017. – №3. – С. 16-21. DOI: [10.18565/urol.2017.3.16-21](https://doi.org/10.18565/urol.2017.3.16-21)

24. Самбукова, Т.В. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии / Т.В. Самбукова, Б.В. Овчинников, В.П. Ганапольский, А.Н. Ятманов, П.Д. Шабанов // Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии. – 2017 – Том 15, №2 – С. 56–63. DOI: 10.17816/RCF15256-63

25. Сонова, К.В. Использование золотарника в современной медицине / К.В. Сонова // Научный медицинский вестник. – 2015. – Том 2, №2. – С. 61-67. DOI: 10.17117/nm.2015.02.061

26. Сулейманова, Ф.Ш. Антиоксидантная и антибактериальная активность травы золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) / Ф.Ш.К. Сулейманова, О.В. Нестерова, И.Н. Аверцева, В.Ю. Решетняк, В.Н. Матвеев, П.А. Жуков // Вестник Московского университета. Серия 2: Химия. – 2020. – Том 61, №4. – С. 330-332.

27. Сулейманова, Ф.Ш. Микроскопическое изучение травы золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) / Ф.Ш. Сулейманова, О.В. Нестерова, А.А. Матюшин // Сеченовский вестник. – 2017. – Том 29, №3. – С. 57-64.

28. Сулоев, И.С. Морфолого-анатомическое изучение травы золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) / И.С. Сулоев, О.В. Яковлева, Н.А. Дудецкая, В.Г. Лужанин // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2020. – Том 29, №3. – С. 36-44. DOI: 10.34907/JRQAI.2020.84.71.003

29. Сулоев, И.С. О некоторых видах рода Золотарник (обзор) / И.С. Сулоев, Н.А. Дудецкая, Л.С. Теслов, В.Г. Лужанин, Г.П. Яковлев // Журнал научных статей “Здоровье и образование в XXI веке”. – 2019. – Том 21, №6. – С. 68-76. DOI: [10.26787/nydha-2226-7425-2019-21-6-68-76](https://doi.org/10.26787/nydha-2226-7425-2019-21-6-68-76).

30. Сулоев И.С. Сравнительная товароведческая характеристика различных образцов травы золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) // Сборник материалов IX Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего», Санкт-Петербург, 22-23 апреля 2019 г. – СПб.: Изд-во СПХФУ, 2019. – 922 с. (специальный выпуск). – 2019. – С. 800-802.

31. Сулоев, И.С. Стандартизация травы золотарника канадского / И.С. Сулоев, А.О. Понкратова, Н.А. Дудецкая, Л.С. Теслов, В.Г. Лужанин // Фармация. – 2020. – Том 69, №8. – С. 13–20. DOI: 10.29296/25419218-2020-08-02.

32. Тохтабаева, Г.М. Усовершенствование методики количественного определения суммы флавоноидов в траве золотарника канадского (*Solidago canadensis* L.) / Г.М. Тохтабаева, С.М. Баслинов, И.Е. Копылова, Т.А. Сокольская, А.Е. Бурова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2013. – №10. – С. 4-8.

33. Фармакопейная статья «Трава золотарника канадского (*Herba Solidaginis canadensis*)», ФС 42-2777-91. М.: 1991.

34. Федотова, В.В. Анатомо-диагностическое изучение золотарника кавказского (*Solidago caucasica* Kem.-Nath.) флоры Северного Кавказа / В.В. Федотова, Л.М. Елисеева, В.А. Челомбитько // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник научных трудов ПятГФА; под ред. М.В. Гаврилина. – Пятигорск: Пятигорская ГФА, 2012. – Том 67. – С. 128-131.

35. Федотова, В.В. Виды рода золотарник (*Solidago*): значение для медицинской практики, перспективы изучения / В.В. Федотова, В.А. Челомбитько // Научные ведомости. – 2012. – Том 135, №16. – С. 136-145.

36. Федотова, В.В. Фармакогностическое изучение золотарника кавказского (*Solidago caucasica* Kem.–Nath.): дис. канд. фарм. наук: 14.04.02 / Федотова Виктория Владимировна. – Пятигорск, 2014. – 163 с.

37. Федотова, В.В. Фенольные соединения и антибактериальное действие сухого экстракта золотарника кавказского (*Solidago caucasica* Kem.-Nath.). / В.В. Федотова, В.А. Челомбитько, Н.В. Постникова // Медицинский альманах. – 2013. – Том 25, №1. – С. 185-188.

38. Филимонов, Д.А. Компьютерное прогнозирование спектров биологической активности химических соединений: возможности и ограничения. / Д.А. Филимонов, Д.С. Дружиловский, А.А. Лагунин, Т.А. Глориозова, А.В. Рудик, А.В. Дмитриев, П.В. Погодин, В.В. Поройков // Biomedical Chemistry: Research and Methods. – 2018. – Том 1, №1. – С. 1-21. DOI: 10.18097/bmcrm00004

39. Фитохимический и товароведческий анализ лекарственного растительного сырья: учебное пособие к практическим занятиям по фармакогнозии / под. ред. Л.С. Теслова. – СПб: СПХФУ, 2018. – 176 с.

40. Ханина, М.А. Результаты химического исследования *Artemisia gmelinii* Web. ex Stechm. флоры Сибири / М.А. Ханина, Е.А. Серых, Л.М. Покровский, А.В. Ткачёв // Химия растительного сырья. – 2000. – №3. – С. 85-94.

41. Чабан, Н.Г. Литолитическое действие фитопрепаратов при лечении и профилактике мочекаменной болезни / Н.Г. Чабан, А.Е. Степанов, Л.М. Рапопорт // Актуальные вопросы современной медицины. – 2016. – Том 1, №1. – С. 133-134.

42. Черепанов, С.К. Сосудистые растения России и сопредельных государств (в пределах бывшего СССР) / С.К. Черепанов – СПб: Мир и семья, 1995. – 992 с.

43. Abdel Baki, P.M. Aquarectic activity of *Solidago canadensis* L. cultivated in Egypt and determination of the most bioactive fraction / P.M. Abdel Baki, M.M. El-Sherei, A.E. Khaleel, A.A. Abdel Motaal, H.M.I. Abdallah // Iranian journal of pharmaceutical research. – 2019. – Volume 18, №2. – P. 922–937. DOI:10.22037/ijpr.2019.2390.

44. Abhilasha, D. Do allelopathic compounds in invasive *Solidago canadensis* s.l. restrain the native European flora? / D. Abhilasha, N. Quintana, J. Vivanco, J. Joshi // Journal of Ecology. – 2008. – №96. – P. 993-1001. DOI: 10.1111/j.1365-2745.2008.01413.x

45. Anžlovar, S. The Effect of extracts and essential oil from invasive *Solidago* spp. and *Fallopia japonica* on Crop-Borne fungi and wheat germination / S. Anžlovar, D. Janeš, J.D. Koce // Food technology and biotechnology. – 2020. – Volume 58, №3 – P. 273-283. DOI:10.17113/ftb.58.03.20.6635

46. Apati, P. Comprehensive evaluation of different *Solidaginis* Herba extracts / P. Apati, T.Sz. Kristo, E. Szoke, A. Kery, K. Szentmihályi, P. Vinkler // Acta Hort. – 2003. – Volume 597. – P. 69-73.

47. Apáti, P. HPLC Analysis of the Flavonoids in Pharmaceutical Preparations from Canadian Goldenrod (*Solidago canadensis*) / P. Apáti, P.J. Houghton, G. Kite, G.B. Steventon, A. Kery // *Chromatographia*. – 2002. – Volume 56. Supplement – P. 65-68.

48. Apáti, P. In-vitro effect of flavonoids from *Solidago canadensis* extract on glutathione S-transferase / P. Apáti, A. Kéry, P.J. Houghton, G.B. Steventon, G. Kite // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 2006. – Volume 58, Issue 2. – P. 251-256. DOI:10.1211/jpp.58.2.0013

49. Beck, J.B. Genus-wide microsatellite primers for the Goldenrods (*Solidago*; Asteraceae). / J.B. Beck, J.C. Semple, J.M. Brull, S.L. Lance, M.M. Phillips, S.B. Hoot, G.A. Meyer, // *Applications in plant sciences*. – 2014. – Volume 4, №2. DOI: 10.3732/apps.1300093

50. Botta-Dukat, Z. Giant and Canadian goldenrod (*Solidago gigantea* Ait., *S. canadensis* L.). / Z. Botta-Dukat, I. Dancza // *The most important invasive plants in Hungary*. – 2008. – №1. – P. 167-177.

51. Burov, Y.V. National system for registration and biological testing of chemical compounds: facilities for new drugs search / Y.V. Burov, V.V. Poroikov, L.V. Korolchenko // *Bulletin of national Center for Biologically active compounds*. – 1990. – Volume 1. – P. 4-25.

52. Calalb, T. The morpho-anatomical study of *Solidago virgaurea* L. species from the flora of republic of Moldova. / T. Calalb, C. Fursenco, O. Ionita, V. Ghendov // *East European Scientific Journal*. – 2018. – Volume 30, Issue 2. – P. 4-13.

53. Chemical database of natural products “Dictionary of Natural Products” [Electronic resource]. – URL: <https://dnp.chemnetbase.com/faces/chemical/ChemicalSearch.xhtml> (date of treatment: 27.09.2021)

54. Demir, H. Antioxidant and antimicrobial activities of *Solidago virgaurea* extracts / H. Demir, L. Acik, E.B. Bali, L.Y. Koc, G. Kaynak // *African journal of biotechnology*. – 2009. – Volume 8, Issue 2. – P. 274-279.

55. Denes, T. Polyphenol content of *Ononis arvensis* L. and *Rhinanthus serotinus* oborny used in the Transylvanian ethnomedicine / T. Denes, N. Papp, K. Marton, A. Kaszas, A. Felinger, E. Varga, B. Boros // International journal of pharmacognosy and phytochemistry. – 2015. – Volume 30, Issue 1. – P. 1301–1307.
56. Deng, Y. Polyphenols, antioxidant and antimicrobial activities of leaf and bark extracts of *Solidago canadensis* L. / Y. Deng, Y. Zhao, O. Padilla-Zakour, G. Yang // Industrial crops and products. – 2015. – Volume 74. – P. 803-809.
57. Dobjanschi, L. Comparative study of the morphological and phytochemical characterization of Romanian *Solidago* species / L. Dobjanschi, L. Fritea, E.B. Patay, M. Tămaş // Pak. J. Pharm. Sci. – 2019. – Volume 32, №4. – P. 1571-1579.
58. El-Sayed, I.M. Molecular characterization and positive impact of brassinosteroids and chitosan on *Solidago canadensis* cv. tara characteristics / I.M. El-Sayed, R.G. Salim, E.F. El-Haggar, R.A. El-Ziat, D.M. Soliman // Horticulturae. – 2020. – №6. P. 1-18. DOI: 10.3390/horticulturae6040100
59. Elshafie, H.S. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil extracted from *Solidago canadensis* L. / H.S. Elshafie, D. Grulova, B. Baranova, L. Caputo, L. de Martino, V. Sedlak, I. Camele, V. de Feo // Molecules. – 2019. – Volume 24, Issue 7. – P. 1-12. DOI: 10.3390/molecules24071206
60. El-Sherei, M. Effect of Seasonal Variation on the Composition of the Essential Oil of *Solidago canadensis* Cultivated in Egypt / M. El-Sherei, A. Khaleel, A.A. Motaal, P. Abd-Elbaki // Journal of Essential Oil Bearing Plants. – 2014. – Volume 17, Issue5. – P. 891-898. DOI: [10.1080/0972060X.2014.901612](https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.901612)
61. Fursenco, C. *Solidago virgaurea* L.: A review of its ethnomedicinal uses, phytochemistry, and pharmacological activities (review). / C. Fursenco, T. Calalb, L. Uncu, M. Dinu, R. Ancuceanu, // Biomolecules. – 2020. – Volume 12, №10. – P. 1619: DOI: 103390/biom10121619.
62. Ganeshpurkar, A. The pharmacological potential of rutin / A. Ganeshpurkar, A.K. Saluja // Saudi pharmaceutical journal. – 2016. – Volume 25, Issue 2. – P. 149-164. DOI: [10.1016/j.jsps.2016.04.025](https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.04.025).

63. Gross, S.C. Antineoplastic activity of *Solidago virgaurea* on prostatic tumor cells in an SCID mouse model / S.C. Gross, G. Goodarzi, M. Watabe, S. Bandyopadhyay, S.K. Pai, K. Watabe // Nutrition and cancer. – 2002. – Volume 43, Issue 1. – P. 76-81. DOI: 10.1207/S15327914NC431_9

64. Harvey, M.A. Tolterodine versus oxybutynin in the treatment of urge urinary incontinence: a meta-analysis. / M.A. Harvey, K. Baker, G.A. Wells // American journal of obstetrics gynecology. – 2001. – Volume 185, Issue 1. P. 56-61. DOI: 10.1067/mob.2001.116371

65. Huang, B. Chemical composition and cytotoxic activities of the essential oil from the inflorescences of *Solidago canadensis* L., an invasive weed in Southeastern China / B. Huang, Y. Lei, L. Qin, J. Liu // Journal of Essential Oil Bearing Plants. – 2012. – Volume 15, Issue 4. – P. 667 - 671. DOI: [10.1080/0972060X.2012.10644103](https://doi.org/10.1080/0972060X.2012.10644103)

66. Huang, Y. Chemical constituents from *Solidago canadensis* with hypolipidemic effects in HFD-fed hamsters / Y. Huang, Y.L. Hao, X.Y. Mao // Journal of Asian natural products research. – 2013. – Volume 15, Issue 4. – P. 319–324. DOI: 10.1080/10286020.2012.753059

67. Jankowski, C.K. On the origin of some cubebene derivatives — Diels–Alder adducts and the diene structures of *Solidago* compounds / C.K. Jankowski, A. Pelletier, E.T. Diaz, J.M.R. Belanger, J.J.R. Pare, A. Aumelas, T. Besson, M. de F. Pereira, L. Mauclaire // Canadian Journal of Chemistry. – 2007. – №85. – P. 996–1005. DOI: 10.1139/V07-112

68. Kalemba, D. Analysis of the Essential Oil of *Solidago canadensis* / D. Kalemba, J. Gora, A. Kurowska // Planta Medica. – 1990. – Volume 56, Issue 2. – P. 222-223. DOI: 10.1055/s-2006-960930

69. Kasali, A.A. Epi-Cubebanes from *Solidago canadensis* / A.A. Kasali, O. Ekundayo, C. Paul, W.A. König // Phytochemistry. – 2002. – Volume 59, Issue 8. – P. 805-810. DOI: 10.1016/s0031-9422(02)00006-7

70. Kolodziej, B. Antibacterial and antimutagenic activity of extracts aboveground parts of three *Solidago* species: *Solidago virgaurea* L., *Solidago*

canadensis L. and *Solidago gigantea* Ait. / B. Kolodziej, R. Kowalski, B. Kedzia // Journal of medicinal plants research. – 2011. – Volume 5, №31. – P. 6770-6779. DOI: 10.5897/JMPR11.1098

71. Kulkarni, P. Role of supportive drugs in the management of urinary tract infections in hospital settings - a prospective observational study / P. Kulkarni, A. Kuruvilla, R. Roy // National Journal of Physiology, Pharmacy and Pharmacology. – 2019. – Volume 9, Issue 4. – P. 299-302 DOI: 10.5455/njppp.2019.9.0102206022019.

72. Li, J. In vitro evaluation of potential bitterness-masking terpenoids from the Canada Goldenrod (*Solidago canadensis*) / J. Li, L. Pan, J.N. Fletcher, W. Lv, Y. Deng, M.A. Vincent, J.P. Slack, T.S. McCluskey, Z. Jia, M. Cushman, A.D. Kinghorn // Journal of Natural Products. – 2014. – Volume 77, Issue 7. – P. 1739–1743. DOI: 10.1021/np5001413

73. Lonard, R.I. The biological flora of coastal dunes and wetlands: *Solidago sempervirens* L. and *Solidago sempervirens* L. subsp. *mexicana* (L.) Semple / R.I. Lonard, F.W. Judd, R. Stalter // Journal of Coastal Research. – 2015. – Volume 31, Issue 6. – P. 1512–1520. DOI: 10.2112/JCOASTRES-D-14-00261.1

74. Mabry, J.T. The Systemic Identification of Flavonoids. / J.T. Mabry, K.R. Markham, M.B. Thomas. – 2nd ed. – New York: Springer-Verlag, 1970. – 362 p.

75. Marksa, M. Development of an HPLC post-column antioxidant assay for *Solidago canadensis* radical scavengers / M. Marksa, J. Radušienė, V. Jakštas, L. Ivanauskas, R. Marksiene // Natural Product Research. – 2015. – Volume 30, Issue 5. – P. 536-543. DOI: 10.1080/14786419.2015.1027703

76. Mishra, D. Chemical composition, analgesic and antimicrobial activity of *Solidago canadensis* essential oil from India / D. Mishra, Sh. Joshi, S. Pilkhwal Sah, G. Bisht // Journal of Pharmacy Research. – 2011. – Volume 4, Issue 1. – P. 63-66.

77. Mortelmans, L.J.M. Use of tramadol drip in controlling renal colic pain / L.J.M. Mortelmans, D. Desruelles, J.A. Baert, K.R. Hentet, G.G. Tailly // Journal of

endourology. – 2006. – Volume 20, Issue 12. – P. 1010-1015. DOI: [10.1089/end.2006.20.1010](https://doi.org/10.1089/end.2006.20.1010)

78. Motaal, A.A. In-vitro anti-inflammatory activity of caffeoylquinic acid derivatives from *Solidago virgaurea* in rats / A.A. Motaal, Sh. M. Ezzart, M.G. Tadros, H.I. El-Askary // *Pharmaceutical Biology*. – 2016. – Volume 54, Issue 2. – P. 2864-2870. DOI: 10.1080/13880209.2016.1190381

79. Native Plant Trust. Go Botany. [Electronic resource]. – URL: <https://gobotany.nativeplanttrust.org/species/solidago/canadensis/> (date of treatment: 20.08.2020).

80. Pepeljnjak, S. Investigation of the antimycotic activity of *Solidago virgaurea* and *Solidago gigantea* extracts / S. Pepeljnjak, D. Kustrak, I. Vukusic // *Pharmaceutical and pharmacological letters*. – 1998. – Volume 8, Issue 2. – P. 85-86.

81. Poroikov, V.V. Pass biological activity spectrum predictions in the enhanced open NCI database browser / V.V. Poroikov, D.A. Filimonov, W-D. Ihlenfeldt, T.A. Glorizova, A.A. Lagunin, Y.V. Borodina, A.V. Stepanchikova, M.C. Nicklaus // *Journal of chemical information and computer sciences*. – 2003. – Volume 43, Issue 1. – P. 228-236. DOI: 10.1021/ci020048r.

82. Radušiene, J. Assessment of phenolic compound accumulation in two widespread goldenrods / J. Radušiene, M. Marska, L. Ivanauskas, V. Jakštas, B. Karpaviciene // *Industrial crops and products*. – 2014. – Volume 63. – P. 158-166.

83. Ravichandiran, V. In vitro anti-cancer activity of *Solidago canadensis* L. / V. Ravichandiran, N. Deepa // *International journal of research in pharmaceutical sciences*. – 2012. – Volume 3, Issue 1. – P. 158-162.

84. Schmeda-Hirschmann, G. Gastroprotective activity of the diterpene solidagenone and its derivatives on experimentally induced gastric lesions in mice / G. Schmeda-Hirschmann, J. Rodriguez, L. Astudillo // *Journal of ethnopharmacology* – 2002. – Volume 81, Issue 1. – P. 111-115. DOI: 10.1016/s0378-8741(02)00054-5.

85. Semple J. (2020) Astereae Lab. University of Waterloo (Waterloo). [Electronic resource]. – URL: <https://uwaterloo.ca/astereae-lab> (date of treatment: 26.04.2020).

86. Shelepova, O. Assessment of flavonoids and phenolic compound accumulation in invasive *Solidago canadensis* L. in Slovakia / O. Shelepova, Y. Vinogradova, O. Vergun, O. Grygorieva, J. Brindza // Potravinarstvo Slovak journal of food sciences. – 2020. – Volume 14. – P. 587-594. DOI: 10.5219/1378.

87. Shelepova, O. Constituents of the essential oil in *Solidago canadensis* L. from Eurasia / O. Shelepova, Y. Vinogradova, B. Zaitchik, A. Ruzhutsky, O. Grygorieva, J. Brindza // Slovak journal of food sciences. – 2018. – Volume 12, №1. – P. 20-25. DOI: 10.5219/847.

88. Suleymanova, F. HPLC Quantification of Hydroxycinnamic and Organic Acids of Canadian Goldenrod (*Solidago canadensis* L.) / F. Suleymanova, O. Nesterova, A. Matyushin // Pharmacognosy journal. – 2019. – Volume 11, Issue 2. – P. 400-404. DOI: 10.5530/pj.2019.11.62

89. Suloev, I.S. Isolation of individual flavonoids from *Solidago canadensis* L. / I.S. Suloev, V.G. Luzhanin // Reviews of clinical pharmacology and drug therapy. – 2017. – №15. – C. 66.

90. Szymura, M. Morphological and cytological diversity of goldenrods (*Solidago* L. and *Euthamia* Nutt.) from south-western Poland. / M. Szymura, T.H. Szymura, A. Kreitschitz // Biodiversity: research and conservation. – 2015. – №38. – P. 41-49. DOI: 10.1515/biorc-2015-0010

91. Wang, B. Potassium-sparing effects of furosemide in mice on high-potassium diets / B. Wang, S.C. Sansom // American journal of physiology, renal physiology. – 2019. – Volume 316, Issue 5. – P. 970–973. DOI: [10.1152/ajprenal.00614.2018](https://doi.org/10.1152/ajprenal.00614.2018).

92. Wangensteen, H. New labdane diterpenes from *Solidago canadensis* / H. Wangensteen, Th.T. Phan, F. Rise, T.G. Halvorsen, K.E. Malterud // Natural product research. – 2012. – Volume 26, №14. – P. 1348–1354. DOI: 10.1080/14786419.2011.565005

93. World Flora Online. Consortium WFO (2020). [Electronic resource]. –
URL: <http://www.worldfloraonline.org> (date of treatment: 29.08.2020).

ПРИЛОЖЕНИЕ

«УТВЕРЖДАЮ»

Управляющий

АО «Фармпроект»


С.С. Саакян

«28» ноября 2022 г.

г. Санкт-Петербург

АКТ о внедрении

- 1. Наименование предложения для внедрения:** методики выделения индивидуальных соединений растительного происхождения – потенциальных фармакологических субстанций, относящихся к классам флавоноидов, производных кверцетина.
- 2. Кем разработано:** аспирантом кафедры фармакогнозии ФГБОУ ВО СПбФУ Минздрава России И. С. Суловым.
- 3. Где и когда внедрено:** компания «Фармпроект».
- 4. Результаты внедрения:** положительные.
- 5. Эффективность внедрения:** разработанные автором методики выделения индивидуальных соединений позволили повысить производительность выделения, очистки и наработки индивидуальных соединений из природных источников.

Ответственный за внедрение:  Руководитель отдела по разработкам и развитию АО «Фармпроект»



А.С. Дзюба

УТВЕРЖДАЮ
Ректор ФГБОУ ВО СПХФУ

Миздрава России,
д.фарм.н., профессор

И.А. Наркевич

2022 г.

г. Санкт-Петербург



**АКТ внедрения
результатов научно-практической работы
в учебный процесс**

Комиссия в составе:

Председателя	проректора по учебной работе, канд. фармацевт. наук.	Ю.Г. Ильиновой
И членов комиссии	начальника учебно-методического отдела директора департамента науки и подготовки научно-педагогических кадров, канд. биол. наук	Д.С. Грицаненко И.А. Титович

назначенная приказом ФГБОУ ВО СПХФУ Миздрава России от «12» марта 2021 г. №100, составила акт о нижеследующем.

Результаты диссертационного исследования Сулоева Ивана Сергеевича на тему: «Фармакогностическое исследование, стандартизация травы золотарника канадского и перспективы выделения природных компонентов с прогнозируемой фармакологической активностью», представленного на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук, а именно: «методика выделения индивидуальных соединений растительного происхождения – потенциальных фармакологических субстанций, относящихся к классам флавоноидов, производных кверцетина» внедрены в учебный процесс по учебной дисциплине «Фармакогнозия» в рамках программы высшего образования – программы специалитета по специальности 33.05.01 Фармация, профиль «Фармация», очной формы обучения.

Председатель	проректор по учебной работе, канд. фармацевт. наук.	Ю.Г. Ильинова
члены комиссии	начальник учебно-методического отдела директор департамента науки и подготовки научно-педагогических кадров, канд. биол. наук	Д.С. Грицаненко И.А. Титович

«УТВЕРЖДАЮ»
 Ректор ФГБОУ ВО СПХФУ
 Минздрава России,
 д.фарм.н., профессор
 И.А. Наркевич
 2022 г.
 г. Санкт-Петербург



**АКТ внедрения
 результатов научно-практической работы
 в учебный процесс**

Комиссия в составе:

Председателя	проректора по учебной работе, канд. фармацевт. наук.	Ю.Г. Ильиновой
И членов комиссии	начальника учебно-методического отдела директора департамента науки и подготовки научно-педагогических кадров, канд. биол. наук	Д.С. Грицаненко И.А. Титович

назначенная приказом ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России от «12» марта 2021 г. №100, составила акт о нижеследующем.

Результаты диссертационного исследования Сулоева Ивана Сергеевича на тему: «Фармакогностическое исследование, стандартизация травы золотарника канадского и перспективы выделения природных компонентов с прогнозируемой фармакологической активностью», представленного на соискание учёной степени кандидата фармацевтических наук, а именно: «Методика выделения индивидуальных соединений растительного происхождения – потенциальных фармакологических субстанций, относящихся к классам флавоноидов, производных кверцетина» внедрены в учебный процесс по учебной дисциплине «Фармакогнозия» в рамках программы высшего образования – программы бакалавриата по направлению подготовки 04.03.01 Химия, профиль «Физико-химические методы анализа в производстве и контроле качества лекарственных средств».

Председатель	проректор по учебной работе, канд. фармацевт. наук.	 Ю.Г. Ильинова
члены комиссии	начальник учебно-методического отдела директор департамента науки и подготовки научно-педагогических кадров, канд. биол. наук	 Д.С. Грицаненко  И.А. Титович

УТВЕРЖДАЮ
Ректор ФГБОУ ВО СПХФУ
Минздрава России
д.фарм.н., профессор

И.А. Наркевич

«02» 2022 г.



**Акт внедрения
результатов научно-практической работы
в научный процесс**

Комиссия в составе:

Председателя	проректора по научной работе, д-р. фармацевт. наук.	Е.В. Флисюк
и членов комиссии	научный сотрудник департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров	К.О. Сидоров
	директора департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, канд. биол. наук	И.А. Титович

назначенная приказом ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России от «12» марта 2021 г. № 100, составила акт о нижеследующем.

Результаты диссертационного исследования Сулоева Ивана Сергеевича на тему «Фармакогностическое исследование, стандартизация травы золотарника канадского и перспективы выделения природных компонентов с прогнозируемой фармакологической активностью», представленного на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук, а именно: «методика выделения индивидуальных соединений растительного происхождения – потенциальных фармакологических субстанций, относящихся к классам флавоноидов, производных кверцетина», использовано в научно-исследовательской деятельности кафедры фармакогнозии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации в рамках выделения и установления структуры природных соединений.

Председателя	проректора по научной работе, д-р. фармацевт. наук.	Е.В. Флисюк
и членов комиссии	научный сотрудник департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров	К.О. Сидоров
	директор департамента науки и подготовки научно- педагогических кадров, канд. биол. наук	И.А. Титович