

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ
«ВИТЕБСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ОРДЕНА ДРУЖБЫ НАРОДОВ
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

УДК 615.32:615.07

Лукашов
Роман Игоревич

СТАНДАРТИЗАЦИЯ, ХИМИЧЕСКИЙ СОСТАВ И
ФАРМАКОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ЦВЕТКОВ
РУДБЕКЦИИ ШЕРШАВОЙ (*RUDBESKIA HIRTA L.*)

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

по специальности 14.04.01 – Технология получения лекарств. Фармацевтическая химия, фармакогнозия. Организация фармацевтического дела

Витебск 2015

Научная работа выполнена в УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Научный руководитель: **Моисеев Дмитрий Владимирович**, кандидат фармацевтических наук, доцент, заведующий кафедрой стандартизации лекарственных средств с курсом факультета повышения квалификации и переподготовки кадров УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

Официальные оппоненты: **Царенков Валерий Минович**, доктор фармацевтических наук, ведущий консультант по науке управления инновационного развития РУП «Белмедпрепараты», Заслуженный работник промышленности Республики Беларусь

Алексеев Николай Александрович, кандидат фармацевтических наук, заместитель директора по науке и развитию УП «Минскинтеркапс»

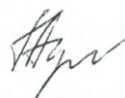
Оппонирующая организация: УО «Белорусский государственный медицинский университет»

Защита диссертации состоится 5 февраля 2016 года в 13⁰⁰ на заседании совета по защите диссертаций Д 03.16.02 при УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» по адресу: 210023, г. Витебск, пр-т Фрунзе, 27 (конференц-зал морфологического корпуса, 7 этаж), e-mail: admin@vgmu.vitebsk.by, телефон ученого секретаря: (80212) 60-14-08; (8029) 217-62-05.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет».

Автореферат разослан «30» декабря 2015 года.

Ученый секретарь
совета по защите диссертаций Д 03.16.02



Г.А. Хуткина

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время на фармацевтическом рынке Республики Беларусь отмечен высокий спрос на иммуностропные фитопрепараты на основе растений рода эхинацея (*Echinacea* Moench.) [Р.И. Лукашов, О.А. Веремчук, А.М. Моисеева, 2015]. Постоянное и длительное применение этих лекарственных средств приводит к возникновению перекрестной устойчивости между различными лекарственными формами на основе растений этого рода [Г.Б. Катцунг, 2008]. Перекрестная иммунологическая устойчивость между эхинацеей пурпурной (*Echinacea purpurea* L.) и рудбекией шершавой (*Rudbeckia hirta* L.) отсутствует [J. Nemetz, 2004]. Поэтому перспективным растением с предположительными иммуномодулирующими свойствами считаем филогенетически близкого к роду эхинацея представителя рода рудбекия (*Rudbeckia* L.) – рудбекию шершавую. В агроклиматических условиях Республики Беларусь рудбекия шершавая успешно развивается и проходит все стадии онтогенеза с минимальными отклонениями от нативных североамериканских форм [И.Н. Кабушева, 2007], что позволяет ее широко культивировать на данной территории.

Установлен качественный состав флавоноидов травы [М.Н. Moubasher, 1989; W. Cisowski, W. Dembinska-Migas, M. Luczkiewicz, 1993] и лепестков с небольшой биомассой [W. Thompson [et al.], 1972; K. Schlangen [et al.], 2009] рудбекии шершавой. Стебли растения содержат меньше флавоноидов в сравнении с цветками и листьями, в цветках доминирует патулетрин в отличие от листьев [M. Luczkiewicz, W. Cisowski, E. Majewska, 1998], гидроксикоричные кислоты преимущественно концентрируются в соцветиях [И.В. Дойко, 2003].

Метанольное извлечение из цветков рудбекии шершавой содержит флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, стимулирует индуцированную фитогемагглютинином пролиферацию спленоцитов мыши [B.R. Michael [et al.], 2014]. Метанол относят к растворителям класса 2, т.е. следует ограничивать его использование для производства лекарственных средств, поэтому возникает потребность в поиске менее токсичных и более доступных экстрагентов.

Из водного извлечения надземной части рудбекии шершавой выделен лектин, который оказывает иммуномодулирующее действие [J. Nemetz, 2004]. Однако показано, что иммуностропное действие извлечения сильнее, нежели отдельных его компонентов [B.R. Michael [et al.], 2014]. Поэтому при изучении предпочтение отдается экстракционным лекарственным формам, содержащим комплекс биологически активных веществ (БАВ), а не индивидуальным компонентам. Среди этих форм наиболее рациональными считаются стандартизированные спиртовые извлечения (настойки, экстракты и др.) с длительным сроком годности (2–3 года). Водные извлечения (настои, отвары, чай) нестабильны, хранятся 2 суток и требуют строгого соблюдения технологии приготовления в домашних условиях, что делает их применение ограниченным.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Связь работы с научными программами (проектами), темами

Тема диссертации соответствует подпункту 2.7. «Новые лекарственные средства и биокорректоры различных заболеваний, фармацевтические субстанции, современные диагностические тест-системы, технологии их производства, оценки качества и безопасности» перечня приоритетных направлений научных исследований Республики Беларусь на 2011–2015 годы, утвержденного постановлением Совета Министров Республики Беларусь от 19.04.2010 г. № 585.

Диссертационная работа выполнена в рамках темы: «Скрининг фитообъектов флоры Республики Беларусь с иммуотропной активностью» (номер государственной регистрации 20121937 от 20.06.2012 г.), а также в рамках темы: «Создание лекарственного средства иммуномодулирующего действия на основе цветков рудбекии шершавой», финансируемой Белорусским республиканским фондом фундаментальных исследований (номер договора М13М-096 от 16.04.2013 г., номер государственной регистрации 20131568 от 17.07.2013 г.).

Цель и задачи исследования

Цель исследования: разработать методики хроматографического и спектрофотометрического определения фенольных соединений (ФС), экспериментально обосновать показатели качества и провести доклиническую оценку безопасности и фармакологического действия рудбекии шершавой цветков (*Rudbeckia hirta flores*).

Задачи исследования:

1. На основе оптимальных условий экстракции патулетрина, суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот из рудбекии шершавой цветков разработать и валидировать методики количественного определения патулетрина, суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот, суммы ФС.

2. Установить показатели подлинности (микроскопия, условия проведения тонкослойной хроматографии (ТСХ)) и нормы показателей доброкачественности (числовых показателей, количественного определения) для подготовки нормативной документации на рудбекии шершавой цветки.

3. Изучить зависимости содержания суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот от периода заготовки и температуры сушки рудбекии шершавой цветков, а также оценить стабильность рудбекии шершавой цветков при хранении.

4. Оценить *in vivo* безопасность настойки и настоя рудбекии шершавой цветков при исследовании острой, подострой токсичности и тимусопротекторное действие настойки на модели стрессовой инволюции тимуса у крыс.

5. Определить *in vitro* иммуотропные свойства настойки и настоя в спонтанной и индуцированной реакции бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) человека, реакции индукции синтеза иммуноглобулинов класса G и изучить зависи-

мость антирадикального эффекта, выявленного в реакции с 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилом (DPPH·), от концентрации ФС.

Научная новизна

Получены экспериментальные данные об оптимальных условиях экстракции патулетрина, суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот из рудбекии шершавой цветков и об условиях проведения реакции ФС данного лекарственного растительного сырья (ЛРС) с *реактивом фосфорномолибденово-вольфрамовым Р*, на основании чего впервые разработаны и валидированы методики количественного определения патулетрина, суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот и суммы ФС соответственно в рудбекии шершавой цветках.

Впервые экспериментально обоснованы показатели подлинности (микроскопия, условия проведения ТСХ) и доброкачественности (нормы числовых показателей и количественного определения) рудбекии шершавой цветков. Впервые изучены зависимость содержания суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот от температуры сушки рудбекии шершавой цветков и их стабильность при хранении в течение двух лет.

Получены новые экспериментальные данные о тимусопротекторных свойствах настойки. Впервые установлена способность настойки и настоя рудбекии шершавой цветков к стимулированию спонтанной пролиферации лимфоцитов человека и индуцированного *Staphylococcus aureus (S.aureus)* синтеза иммуноглобулинов класса G, а также к дозозависимому поглощению радикалов DPPH· *in vitro*. Впервые доказана безопасность настойки и настоя рудбекии шершавой цветков при изучении острой и подострой токсичности.

Положения, выносимые на защиту

1. Методики количественного определения суммы ФС, суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот, патулетрина в рудбекии шершавой цветках, разработанные впервые на основе экспериментально установленных оптимальных условий экстракции суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот, патулетрина и прошедшие процедуру валидации. Зависимости содержания суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот от периода заготовки и температуры сушки рудбекии шершавой цветков.

2. Показатели подлинности и нормы показателей доброкачественности, установленные впервые для рудбекии шершавой цветков: микроскопия; условия проведения ТСХ; потеря в массе при высушивании должна быть не более 14,0%; содержание общей золы – не более 14,0%; содержание золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, – не более 2,0%; содержание БАВ – не менее 2,5% суммы ФС, не менее 1,5% суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот, не менее 0,3% патулетрина. Новые экспериментальные данные по изменению показателей качества рудбекии шершавой цветков, выявленные в течение двух лет хранения в защищенном от света месте при комнатной температуре.

3. Тимусопротекторное действие настойки рудбекии шершавой цветков, установленное впервые на модели стрессовой инволюции тимуса у крыс; способность настойки и настоя стимулировать спонтанную, индуцированную фитогемагглютинином пролиферацию лимфоцитов человека и индуцированный *S.aureus* синтез иммуноглобулинов класса *G in vitro*. Зависимость тимусопротекторного, иммуностропного и антирадикального эффекта от дозы. Безопасность настойки и настоя рудбекии шершавой цветков при однократном и длительном применении (отсутствие острой, подострой токсичности) и принадлежность их VI классу токсичности – относительно безвредные средства, т.к. DL₅₀ при интрагастральном введении мышам составляют более 5000 мг/кг.

Личный вклад соискателя

Формулирование цели и задач исследования, положений, выносимых на защиту, и заключения проведено совместно с научным руководителем. Автором спланирована и выполнена вся экспериментальная часть работы, проведены статистическая обработка данных, анализ литературных источников, обобщение результатов, написание диссертационной работы и автореферата. Техническую помощь в работе с лабораторными животными, в гистологическом исследовании оказывали сотрудники научно-исследовательской лаборатории, в постановке РБТЛ – сотрудники кафедры клинической микробиологии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет». Теоретическое обсуждение и оформление результатов в виде научных публикаций проведено совместно с научным руководителем. Соавтором публикаций является научный руководитель: кандидат фармацевтических наук, доцент Д.В. Моисеев. Личный вклад соискателя – 90%.

Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов

Материалы диссертации доложены и обсуждены на X и XIII международных научно-практических конференциях «Студенческая медицинская наука XXI века» (Витебск, 2010, 2013 гг.), 67-ой и 69-ой научных сессиях сотрудников университета «Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации» (Витебск, 2012, 2014 гг.), международной научно-практической конференции «Белорусские лекарства» (Минск, 2012 г.), Всеукраинской научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы создания новых лекарственных средств» (Харьков, 2012 г.), 65-ой итоговой научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы современной медицины и фармации» (Витебск, 2013 г.), научных сессиях Белорусского государственного медицинского университета (Минск, 2013, 2014 гг.), международной конференции «Биологически активные вещества растений – изучение и использование» (Минск, 2013 г.), международной научно-практической конференции «Молодежь в науке – 2013» (Минск, 2013 г.), XII Международной конферен-

ции «Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы» (Минск, 2014 г.), Республиканской конференции молодых ученых с международным участием «Минский консилиум – 2014» (Минск, 2014 г.), 71-ой научной конференции студентов и аспирантов Белорусского государственного университета (Минск, 2014 г.), республиканской научно-практической конференции с обучающим семинаром «Лекарственные средства Республики Беларусь» в рамках 21-ой Международной специализированной выставки «Здравоохранение Беларуси – 2014» (Минск, 2014 г.) и IV Всероссийской научно-практической конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (Санкт-Петербург, 2014 г.).

Получен патент на изобретение № 19467 от 30.08.2015 г. Утверждены и приняты к использованию в УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» два рационализаторских предложения.

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертационного исследования, используются в УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», УО «Витебская государственная ордена «Знак почета» академия ветеринарной медицины» и в ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», что подтверждено пятью актами о практическом использовании результатов исследования.

Опубликование результатов диссертации

По материалам диссертационного исследования опубликованы 22 работы. В журналах, включенных в «Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований», опубликовано 6 статей (объем в авторских листах – 2,7). В материалах конференций и тезисах доклада опубликовано 14 работ (объем в авторских листах – 1,7). Материалы фармакопейной статьи «Рудбекии шершавой цветки» опубликованы для ознакомления и обсуждения в журнале «Новости экспертизы и регистрации». Опубликовано сведения о патенте на изобретение. Общий объем опубликованных работ – 4,6 авторских листа.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа написана на 222 страницах на русском языке и состоит из введения, общей характеристики работы, основной части, которая включает пять глав (аналитический обзор литературы; материалы и методы исследований; три главы результатов экспериментальных исследований), заключения, библиографического списка и приложений. Работа содержит 53 таблицы, которые занимают 24 страницы, и 57 рисунков, которые занимают 16 страниц. Приложения занимают 20 страниц. Библиографический список занимает 22 страницы и включает 283 источника, в т.ч. 174 – на иностранных языках и 22 публикации соискателя. Объем текста без библиографического списка и приложений – 180 страниц.

ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ

Глава 1 Аналитический обзор литературы

В аналитическом обзоре литературы рассмотрены вопросы, касающиеся систематики и ботанико-фармакогностической характеристики рода *Rudbeckia* L., представлены ботанико-географическое описание, современное состояние исследований химического состава и фармакологических свойств *Rudbeckia hirta* L.

Глава 2 Материалы и методы исследований

Объектом исследований служили рудбекии шершавой цветки (*Rudbeckia hirta flores*), заготовленные в различных регионах Республики Беларусь с июня по сентябрь.

Фитохимический анализ проводили, используя качественные химические реакции, ТСХ, высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ) со спектрофотометрическим (фотодиодноматричным) и масс-спектрометрическим детектированием.

Для идентификации флавоноидов и гидроксикоричных кислот в условиях ТСХ и ВЭЖХ использовали стандартные образцы данных БАВ.

Спектрофотометрическое определение суммы ФС основано на их взаимодействии с реактивом фосфорномолибденово-вольфрамовым *P* в натрия карбоната растворе *P*. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 760 нм.

Валидацию разработанных методик проводили согласно Государственной фармакопее Республики Беларусь (ГФ РБ) и Техническому кодексу установившейся практики (ТКП) «Валидация методик испытаний» 432-2012 (02041).

Внешние, анатомо-диагностические признаки и числовые показатели определяли по методикам, изложенным в ГФ РБ.

Настойку рудбекии шершавой цветков получали методом мацерации. Настой готовили в соответствии со статьей ГФ РБ «Настои, отвары и чай».

Токсикологические и фармакологические исследования на лабораторных животных (*in vivo*) и в культуре клеток (*in vitro*) выполняли согласно ТКП «Надлежащая лабораторная практика» 125-2008 (02040) и руководствам по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ.

Исследования *in vivo* проводили на беспородных половозрелых мышах и крысах обоих полов, которых содержали в виварии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет». Масса мышей составила 18–22 г. Масса крыс – 180–220 г.

Тимусопротекторное действие изучали на модели стрессовой инволюции тимуса, вызванной фиксацией животных в положении «на спине» в течение четырех часов. Крысам на протяжении четырех суток интрагастрально вводили диспергированный в воде *P* сухой остаток, полученный после отгонки спирта *P* из настойки (исследуемые группы), лекарственное средство сравнения (группа срав-

нения) и воду *P* (контрольная группа). На четвертые сутки животным в указанных группах за один час до моделирования стресс-реакции проводили последнее введение. После моделирования стресс-реакции животных во всех группах сразу же выводили из эксперимента.

Исследования *in vitro* проводили на лимфоцитах человека, выделенных из крови здоровых добровольцев. Культивирование выделенных лимфоцитов осуществляли в жидкой питательной среде RPMI 1640, которая содержала 25 ммоль эмбриональной телячьей сыворотки, 24 ммоль натрия гидрокарбоната *P* и L-глутамин.

Иммуотропное действие на клеточное звено системы иммунитета устанавливали в спонтанной (т.е. в отсутствие митогена) и индуцированной фитогемагглютинином РБТЛ *in vitro*. Бласттрансформацию оценивали морфологически путем подсчета под световым микроскопом числа бластных форм. Микропрепараты окрашивали орсеином.

Иммуотропное действие на гуморальное звено системы иммунитета устанавливали в реакции индукции *S.aureus* синтеза иммуноглобулинов класса *G in vitro*. Концентрацию иммуноглобулинов класса *G* в культуральной жидкости определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа.

Антирадикальную активность выявляли, используя модельную реакцию, основанную на взаимодействии ФС с долгоживущими радикалами DPPH· *in vitro*. Оптическую плотность измеряли при длине волны 517 нм.

Для сравнения использовали лекарственные средства «Тримунал», «Иммунал», «Рибомунил» и стандартный образец кверцетина.

Результаты представляли в виде $\bar{X} \pm \Delta_{\bar{x}}$, где \bar{X} – среднее значение выборки; $\Delta_{\bar{x}}$ – полуширина доверительного интервала средней величины.

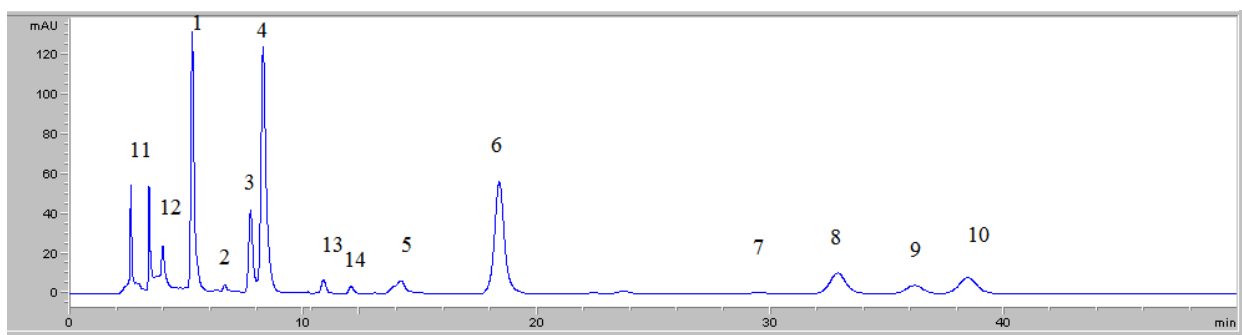
Глава 3 Фитохимический анализ рудбекии шершавой цветков

Используя качественные химические реакции, в рудбекии шершавой цветках обнаружены ФС, флавоноиды, антоцианы, дубильные вещества, полисахариды и эфирное масло.

ТСХ подтвердила наличие флавоноидов, идентифицированы патулетрин и кофейная кислота.

С использованием ВЭЖХ со спектрофотометрическим (фотодиодноматричным) и масс-спектрометрическим детектированием идентифицированы десять флавоноидов и четыре гидроксикоричные кислоты (рисунок 1).

Используя метод внутренней нормализации, определено, что доминирующим соединением фенольной природы являлся маркерный флавоноид – патулетрин [6–8].



1 – кверцетин-3-О-диглюкозид, 2 – рутин, 3 – патулетин-3-О-галактозид, 4 – патулетрин, 5 – хризозериол-3-О-рамнозид, 6 – мирицетин, 7 – хризозериол-3-О-глюкозид, 8 – кверцетагетин, 9 – лютеолин, 10 – патулетин, 11 – хлорогеновая кислота, 12 – кофейная кислота, 13 – феруловая кислота, 14 – цикориевая кислота
Рисунок 1. – Хроматограмма спиртового извлечения из рудбекии шершавой цветков при длине волны детекции 360 нм

Оптимальные условия экстракции суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот, патулетрина из рудбекии шершавой цветков:

- ✓ экстрагент – спирт *P* (50%, об/об);
- ✓ температура экстракции – 60°C;
- ✓ продолжительность экстракции – 30 мин;
- ✓ однократная экстракция;
- ✓ соотношение сырья и экстрагента – 1 к 50;
- ✓ измельченность порошка сырья – 2000 мкм.

Условия хроматографирования:

- колонка длиной 0,25 м и внутренним диаметром 4,6 мм, заполненная силикагелем октилсилильным для хроматографии *P* с размером частиц 5 мкм;
- подвижная фаза: ацетонитрил *P* – 0,01 М раствор калия дигидрофосфата *P*, доведенный кислотой фосфорной *P* до pH 3,0±0,2 (20:80, об/об).

На основе подобранных оптимальных условий экстракции и при помощи ВЭЖХ разработаны методики количественного определения суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот в пересчете на патулетрин, патулетрина в рудбекии шершавой цветках. Методики прошли процедуру валидации по параметрам: специфичность, линейность, точность, правильность, робастность и пригодность хроматографической системы. Относительная неопределенность среднего результата определения содержания суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот составила 4,45% [5].

Оптимальные условия проведения реакции ФС рудбекии шершавой цветков с реактивом фосфорномолибденово-вольфрамовым *P*:

- ✓ объем добавляемого реактива – 1,0 мл;
- ✓ время протекания реакции – 40 мин.

На основе оптимальных условий проведения реакции ФС рудбекии шершавой цветков с реактивом фосфорномолибденово-вольфрамовым *P* разработана спектрофотометрическая методика количественного определения суммы ФС в пересчете на патулетрин в рудбекии шершавой цветках. Методика прошла процедуру валидации по параметрам: линейность, точность, правильность и робастность. Относительная неопределенность среднего результата составила 2,77%.

Валидированные методики количественного определения БАВ в рудбекии шершавой цветках включены в материалы фармакопейной статьи [21].

Глава 4 Стандартизация рудбекии шершавой цветков

Обоснование выбора группы действующих веществ. Патулетрин и кофейная кислота *P* обладали выраженным митогенным и слабым комитогенным (по отношению к фитогемагглютиниону) действием и стимулировали индуцированный *S.aureus* синтез иммуноглобулинов класса *G in vitro* [6, 18]. Поэтому предложено стандартизировать рудбекии шершавой цветки по двум группам БАВ: флавоноиды и гидроксикоричные кислоты.

Показатели подлинности и доброкачественности

Внешние признаки. Уточнено и систематизировано описание цельных и распавшихся цветочных корзинок, отдельных ложноязычковых и трубчатых цветков, лож распавшихся соцветий, листочков обертки, семян.

Микроскопия. Клетки эпидермы ложноязычковых цветков – многоугольные изодиаметрические. По краям зубчиков обнаружены сосочковидные выросты клеток эпидермы. Простые длинные конусовидные волоски с прямой конечной клеткой и заостренным концом расположены только на нижней стороне пластинки лепестка венчика. На обеих сторонах встречались головчатые волоски. Эфиромасличные железки состояли из 10–12 клеток, расположенных в два ряда. Клетки эпидермы трубчатых цветков прямоугольной формы. На верхушках зубчиков видны хохолки, состоящие из двух типов простых волосков: с тонкой игловидной и с конусовидной конечными клетками. На поверхности встречались простые конусовидные волоски, состоящие из нескольких коротких клеток и удлиненной конечной клетки. Эпидерма верхней стороны листочков обертки представлена клетками с сильноизвилистыми стенками и устьичным аппаратом аномоцитного типа. Эпидерма нижней стороны состояла из многоугольных, слегка вытянутых клеток, над жилкой клетки эпидермы многоугольные, сильно вытянутые. Простые тонкие игловидные волоски встречались на обеих сторонах. Клетки вокруг основания волосков расположены радиально и образуют розетку [2].

Тонкослойная хроматография. *Пластинка:* ТСХ пластинка со слоем целлюлозы *P*.

Подвижная фаза: этилацетат *P* – толуол *P* – кислота уксусная ледяная *P* – вода *P* (10:1:10:1, об/об/об/об).

Проявление: пластинку опрыскивали раствором 20 г/л алюминия хлорида Р в 96% спирте Р. Просматривали в УФ-свете при длине волны 365 нм.

Результаты: обнаружили пять флуоресцирующих зон: зона красного цвета ($R_f \sim 0,96-0,99$); зона голубого цвета ($R_f \sim 0,81-0,86$; кофейная кислота); зона желто-зеленого цвета ($R_f \sim 0,70-0,73$; патулетрин); зона желтого цвета ($R_f \sim 0,53-0,55$) и зона желтого цвета ($R_f \sim 0,43-0,46$) [21].

Допустимые примеси. Несырьевые части растения: кусочки стеблей, цветоносов и листьев – не более 3%. Органические примеси: не более 2%. Минеральные примеси: не более 1%.

Потеря в массе при высушивании. Не более 14,0%.

Общая зола. Не более 14,0%.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. Не более 2,0% [20].

Количественное определение. Рудбекии шершавой цветки должны содержать не менее 2,5% суммы ФС; не менее 1,5% суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот и не менее 0,3% патулетрина [5].

Экспериментально обоснованные показатели подлинности и доброкачественности включены в материалы фармакопейной статьи [21].

Периоды заготовки, температура сушки и стабильность

Содержание суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот, а также патулетрина в рудбекии шершавой цветках составило $3,23 \pm 0,06\%$ и $1,62 \pm 0,04\%$ (в фазу начала цветения, дата заготовки – 12 июля); $2,44 \pm 0,05\%$ и $1,02 \pm 0,02\%$ (в фазу массового цветения, дата заготовки – 26 июля) соответственно и являлось максимальным. В другие периоды заготовки содержание этих БАВ снижалось [2, 19].

Содержание суммы ФС, суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот, а также патулетрина в цветках, высушенных воздушно-теневым способом при комнатной температуре, составило $4,03 \pm 0,23\%$; $2,92 \pm 0,05\%$ и $1,35 \pm 0,03\%$ соответственно и являлось максимальным. При тепловой сушке (40, 60, 80 и 100°C) с принудительной вентиляцией их содержание уменьшалось [5, 6, 13].

На протяжении двух лет хранения рудбекии шершавой цветков при комнатной температуре в защищенном от света месте практически не изменялись их показатели подлинности (ТСХ) и доброкачественности (количественные показатели: содержание суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот, содержание патулетрина, потеря в массе при высушивании, содержание суммы ФС). Количественные показатели ЛРС, которое хранилось два года, по сравнению с исходным ЛРС изменялись в пределах 10% (отн.) [6, 17, 21].

Стандартизация настойки. Полученную настойку стандартизировали по показателям: описание, подлинность (ТСХ), содержание этанола, относительная плотность, сухой остаток, количественное определение (содержание суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот) [14]. Качественные и количественные составы флавоноидов и гидроксикоричных кислот настойки и настоя различны.

Глава 5 Токсичность и фармакологические свойства рудбекии шершавой цветков

Доказано отсутствие острой токсичности настойки в дозах 1000, 2500, 5000 и 13000 мг/кг и настоя в дозах 1000, 2500, 5000 и 11000 мг/кг (в пересчете на сухой остаток) при их интрагастральном введении мышам. Настойка и настой относились к VI классу токсичности – относительно безвредные средства, т.к. их DL_{50} составили более 5000 мг/кг [4].

Выявлено отсутствие подострой токсичности настоя в дозах 750, 1500 и 3000 мг/кг при его интрагастральном введении крысам. Настой в изучаемом диапазоне доз не оказывал токсического действия на нервную, эндокринную, дыхательную, сердечно-сосудистую, пищеварительную, мочевыделительную и половую системы, не влиял на гистологическую структуру внутренних органов, не вызывал патологических сдвигов биохимических показателей и кроветворения.

Настойка обладала выраженным тимусопротекторным действием на модели стрессовой инволюции тимуса. Интрагастральное введение настойки крысам в исследуемых группах в дозах 100, 200 и 400 мг/кг приводило к статистически значимому ($p < 0,05$) восстановлению массы, индекса, клеточности и морфологической структуры тимусов, нарушенных в результате развития стрессовой инволюции у животных в контрольной группе, до нормальных значений у крыс в интактной группе. Максимальный тимусопротекторный эффект проявился в дозе 400 мг/кг. Различия «Тримунала» в дозе 45 мг/кг и настойки в дозе 100 мг/кг по тимусопротекторному эффекту на данной модели являлись статистически незначимыми ($p > 0,05$) [1, 10].

Настойка и настой рудбекии шершавой цветков обладали выраженным иммуностимулирующим действием в спонтанной РБТЛ (таблица 1).

Таблица 1. – Процент бластных форм среди общего количества лимфоцитов в исследуемых и контрольных пробах в спонтанной РБТЛ ($n = 12$)

Испытуемый объект	Процент бластных форм среди общего количества лимфоцитов, %			
	Доза 23,4 нмоль/л	Доза 2,34 нмоль/л	Доза 0,234 нмоль/л	Контроль
Настойка рудбекии шершавой цветков	7,1±0,7*	7,5±1,1*	6,9±0,9*	5,0±0,5
	Доза 189 нмоль/л	Доза 18,9 нмоль/л	Доза 1,89 нмоль/л	
Настой рудбекии шершавой цветков	8,0±0,3*	8,8±0,9*	8,7±1,8*	

Примечание – * – статистически достоверные отличия ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными пробами.

Максимальный иммуностропный эффект настойки проявился в дозе 2,34 нмоль/л, настоя – 18,9 нмоль/л, т.е. доза настойки, вызывающая максимальный эффект, практически в 8 раз меньше, чем аналогичный показатель настоя. Значения ED_{50} для «Иммунала» и настойки, рассчитанные по уравнениям регрессии, составили $0,46 \pm 0,03$ и $0,52 \pm 0,08$ нмоль/л соответственно. E_{max} «Иммунала» равен $7,0 \pm 0,5\%$. Настойка в спонтанной РБТЛ равна «Иммуналу» по критерию ED_{50} и равноэффективна ему по силе максимального иммуностропного эффекта [3, 9, 10, 22]. Результаты, полученные в спонтанной РБТЛ, подтверждены в индуцированной фитогемагглютинином РБТЛ [6].

Настойка рудбекии шершавой цветков обладала выраженным иммуностропным действием в реакции индукции *S.aureus* синтеза иммуноглобулинов класса G (таблица 2).

Таблица 2. – Концентрации иммуноглобулинов класса G (мг/мл) в культуральной жидкости исследуемых, контрольных и интактных проб ($n = 8$)

Исследуемые пробы			Контрольные пробы	Интактные пробы
Доза 23,4 нмоль/л	Доза 2,34 нмоль/л	Доза 0,234 нмоль/л		
$2,24 \pm 0,36^*$	$4,13 \pm 0,28^*$	$1,33 \pm 0,11$	$1,20 \pm 0,17$	$0,20 \pm 0,15^*$

Примечание – * – статистически достоверные отличия ($p < 0,05$) по сравнению с контрольными пробами.

Максимальный иммуностропный эффект проявился в дозе 2,34 нмоль/л. Различия «Рибомунилы» в дозе 0,15 мкг/мл (концентрация иммуноглобулинов класса G составила $2,63 \pm 0,21$ мг/мл) и настойки в дозе 23,4 нмоль/л в данной реакции являлись статистически незначимыми ($p > 0,05$) [10–12, 14].

Водное и спиртовые извлечения из рудбекии шершавой цветков обладали выраженным антирадикальным действием в модельной реакции поглощения радикалов DPPH. Процент поглощения радикалов извлечениями находился в широком диапазоне: от $10,6 \pm 1,1$ до $63,7 \pm 4,9\%$. В контроле, куда вносили воду *P* или спирт *P* в концентрации, которая использовалась для получения извлечений, указанный показатель составил 0,4–4,3%. Извлечение, полученное путем экстракции спиртом *P* (50%, об/об), содержало максимальное количество ФС и проявляло наибольший антирадикальный эффект.

Зависимость процента поглощения радикалов извлечением, полученным путем экстракции спиртом *P* (50%, об/об), от концентрации в нем суммы ФС представлена на рисунке 2.

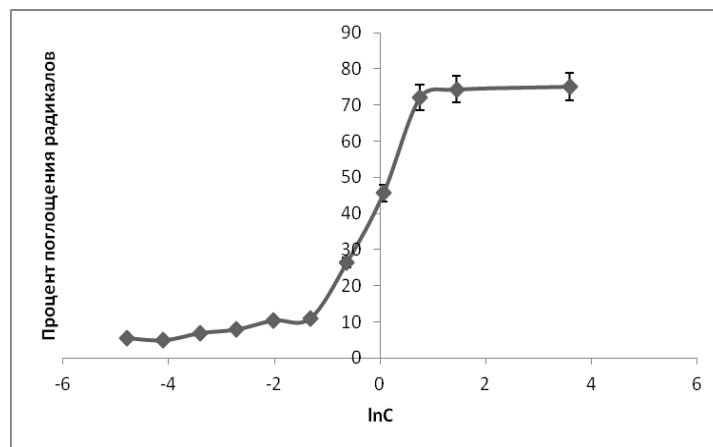


Рисунок 2. – Зависимость процента поглощения радикалов от натурального логарифма концентрации (lnC) суммы ФС в пересчете на патулетрин

Значения IC_{50} для кверцетина и извлечения, полученного путем экстракции спиртом *P* (50%, об/об), найденные с использованием графического метода, составили $0,35 \pm 0,03$ и $0,41 \pm 0,05$ ммоль/л соответственно. I_{max} кверцетина равен $65,3 \pm 1,6\%$. Извлечение, полученное путем экстракции спиртом *P* (50%, об/об), в модельной реакции поглощения радикалов DPPH· равно кверцетину по критерию IC_{50} и эффективнее его по силе максимального антирадикального эффекта [15]. Настойка и настой обладали слабым антимикробным действием [16].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные научные результаты диссертации

1. Разработаны методики количественного определения патулетрина, суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот при помощи ВЭЖХ со спектрофотометрическим (фотодиодноматричным) детектированием. В основе методик лежат данные об оптимальных условиях экстракции патулетрина, суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот из рудбекии шершавой цветков: экстрагент – спирт *P* (50%, об/об); температура экстракции – $60^{\circ}C$; продолжительность экстракции – 30 мин; кратность экстракции – однократная; соотношение сырья и экстрагента – 1 к 50 и степень измельченности порошка сырья – 2000 мкм. Разработанные методики прошли процедуру валидации. Относительная неопределенность среднего результата составляет 4,45%.

Предложена методика количественного определения суммы ФС, основанная на спектрофотометрии окрашенных продуктов реакции ФС с реактивом фосфорномолибденово-вольфрамовым *P* в слабощелочной среде. Методика учитывает закономерности протекания реакции ФС рудбекии шершавой цветков с реактивом фосфорномолибденово-вольфрамовым *P*: объем добавляемого реактива – 1,0 мл и время протекания реакции – 40 мин. Предложенная методика прошла процедуру валидации. Относительная неопределенность среднего результата составляет 2,77% [5–8, 21].

2. Определены показатели подлинности (микроскопия, условия проведения ТСХ) и нормы показателей доброкачественности (числовых показателей, количественного определения) рудбекии шершавой цветков.

Выявлен комплекс анатомо-диагностических признаков (микроскопия), который включает описание клеток эпидермы ложноязычковых и трубчатых цветков, листочков обертки; волосков, расположенных на поверхности ложноязычковых и трубчатых цветков, листочков обертки; валиков, остающихся на месте отпадения волосков; хохолков на верхушках зубчиков трубчатых цветков; эфиромасличных железок.

Подобраны оптимальные условия разделения флавоноидов и гидроксикоричных кислот рудбекии шершавой цветков для проведения ТСХ: система растворителей – *этилацетат R – толуол R – кислота уксусная ледяная R – вода R* (10:1:10:1, об/об/об/об) и неподвижная фаза – *целлюлоза R*.

Установлены следующие нормы числовых показателей: несырьевые части растения (кусочки стеблей, цветоносов и листьев) – не более 3%; органические примеси – не более 2%; минеральные примеси – не более 1%; потеря в массе при высушивании – не более 14,0%; общая зола – не более 14,0% и зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, – не более 2,0%.

Установлены нормы количественного определения: содержание БАВ – не менее 2,5% суммы ФС; не менее 1,5% суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот; не менее 0,3% патулетрина [2, 5, 20, 21].

Экспериментально обоснованные нормы включены в нормативную документацию на рудбекии шершавой цветки [21].

3. Выявлены периоды заготовки и температура сушки рудбекии шершавой цветков, на которые приходится максимальное содержание суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот, а также оценена стабильность рудбекии шершавой цветков при хранении.

На периоды начала и массового цветения (середина и вторая половина июля) приходится максимальное накопление суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот. В другие периоды содержание суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот снижается.

Содержание суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот в рудбекии шершавой цветках, высушенных воздушно-теневым способом при комнатной температуре, является максимальным. Тепловая сушка (40, 60, 80 и 100°C) с принудительной вентиляцией приводит к снижению содержания суммы флавоноидов и гидроксикоричных кислот.

Рудбекии шершавой цветки стабильны на протяжении двух лет хранения при комнатной температуре в защищенном от света месте. Показатели подлинности и доброкачественности в течение двух лет хранения практически не изменяются. Потеря в массе при высушивании и содержание суммы флавоноидов и гид-

роксикоричных кислот в рудбекии шершавой цветках, которые хранились два года, по сравнению с исходным ЛРС изменяются в пределах $\pm 10\%$ (отн.) [2, 5, 6, 13, 17, 19, 21].

4. Установлено в эксперименте *in vivo*, что настойка и настой рудбекии шершавой цветков безопасны, т.к. не обладают острой и подострой токсичностью, настойка проявляет тимусопротекторные свойства на модели стрессовой инволюции тимуса у крыс.

При однократном интрагастральном введении настойки в дозах 1000, 2500, 5000, 13000 мг/кг и настоя в дозах 1000, 2500, 5000, 11000 мг/кг не выявлены случаи летальности мышей в течение четырнадцати суток наблюдения. Настойка и настой принадлежат VI классу токсичности – относительно безвредные средства, т.к. их DL_{50} составляют более 5000 мг/кг.

При интрагастральном введении на протяжении 28 суток настоек в дозах 750, 1500 и 3000 мг/кг не вызывает нарушений нервной, эндокринной, дыхательной, сердечно-сосудистой, пищеварительной, мочевыделительной и половой систем, не влияет на гистологическую структуру внутренних органов, биохимические показатели крови и не нарушает кроветворение у крыс.

Настойка при интрагастральном введении крысам в дозах 100, 200 и 400 мг/кг восстанавливала массу, индекс, клеточность и морфологическую структуру тимусов, нарушенные в результате развития стрессовой инволюции, до нормальных параметров. Максимальный тимусопротекторный эффект проявляется в дозе 400 мг/кг. «Тримунал» в дозе 45 мг/кг восстанавливает изучаемые показатели на уровне настойки в дозе 100 мг/кг [1, 4, 10].

5. Установлено в эксперименте *in vitro*, что настойка и настой рудбекии шершавой цветков обладают иммуностимулирующим действием в спонтанной (т.е. в отсутствие митогена) и индуцированной фитогемагглютинином РБТЛ человека, реакции индукции синтеза иммуноглобулинов класса G и проявляют антирадикальные свойства, дозозависимо поглощая радикалы DPPH.

Настойка в дозах 0,234; 2,34 и 23,4 нмоль/л и настой в дозах 1,89; 18,9 и 189 нмоль/л стимулируют спонтанную пролиферацию лимфоцитов в 1,2–2,2 и 1,3–1,9 раза соответственно в сравнении с контролем. Максимальный иммуностимулирующий эффект настойки проявляется в дозе 2,34 нмоль/л, настоя – в дозе 18,9 нмоль/л, т.е. доза настойки, вызывающая максимальный эффект, практически в восемь раз ниже, чем аналогичная доза настоя. Настойка в спонтанной РБТЛ равна «Иммуналу» по критерию ED_{50} и равноэффективна ему по силе максимального иммуностимулирующего эффекта.

Настойка в дозах 2,34 и 23,4 нмоль/л стимулирует индуцированный *S.aureus* синтез иммуноглобулинов класса G в 2,0–5,2 раза в сравнении с контролем. Максимальный иммуностимулирующий эффект проявляется в дозе 2,34 нмоль/л. «Рибому-

нил» в дозе 0,15 мкг/мл стимулирует синтез иммуноглобулинов класса G в данной реакции на уровне настойки в дозе 23,4 нмоль/л.

Водное и спиртовые извлечения поглощают радикалы DPPH· в диапазоне: от 10,6±1,1 до 63,7±4,9%. Наибольшее поглощение приходится на экстракцию спиртом P (50%, об/об). Максимальный антирадикальный эффект проявляется в диапазоне концентраций: от 2,13 до 8,50 ммоль/л. Извлечение, полученное путем экстракции спиртом P (50%, об/об), на данной модели равно кверцетину по критерию IC₅₀ и эффективнее его по силе максимального антирадикального эффекта [3, 6, 9–12, 14–16, 18, 22].

Рекомендации по практическому использованию результатов

1. Материалы проекта фармакопейной статьи «Рудбекии шершавой цветки» [21] приняты РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» и будут включены во второй том второго издания ГФ РБ. Письмо РУП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении» от 30.06.2015 г. № 12-38/6211.

2. ООО «НПК Биотест» в Гродненском районе заложило плантацию рудбекии шершавой (*Rudbeckia hirta* L.) площадью 200 м². При потребности фармацевтических предприятий, занимающихся переработкой ЛРС, площади плантаций могут быть увеличены. Письмо ООО «НПК Биотест» от 31.08.2015 г. № 3202.

3. Обоснована перспективность применения нового иммуномодулирующего средства – настойки рудбекии шершавой 1:10 (патент на изобретение № 19467 от 30.08.2015 г. [22]).

4. Утверждены и приняты к использованию в УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» рационализаторские предложения: «Способ количественного определения патулетрина в цветках *Rudbeckia hirta* L. методом ВЭЖХ» (регистрационный номер 40 от 26.09.2011 г.) и «Способ экстракции флавоноидов и гидроксикоричных кислот из цветков *Rudbeckia hirta* L.» (регистрационный номер 51 от 25.10.2011 г.).

5. Методики количественного определения БАВ рудбекии шершавой цветков апробированы и внедрены в лаборатории стандартизации и контроля качества лекарственных средств УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (акт о практическом использовании результатов исследования от 8.12.2014 г.).

6. Методики определения показателей качества рудбекии шершавой цветков внедрены в образовательный процесс кафедры стандартизации лекарственных средств с курсом факультета повышения квалификации и переподготовки кадров УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (акт о практическом использовании результатов исследования от 15.09.2014 г.); описание внешних и анатомо-диагностических признаков внедрено в образовательный процесс кафедры ботаники и экологии УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (акт о практи-

ческом использовании результатов исследования от 10.10.2014 г.) и используются для подготовки лекций и лабораторных занятий.

7. Методика оценки тимусопротекторного действия комплекса БАВ рудбекии шершавой цветков на модели инволюции тимуса крыс апробирована и внедрена в научную работу научно-исследовательского института прикладной ветеринарной медицины и биотехнологии УО «Витебская государственная ордена «Знак почета» академия ветеринарной медицины» (акт о практическом использовании результатов исследования от 10.03.2014 г.) и используется в доклинических исследованиях на животных.

Модифицированная методика оценки иммуностропного действия БАВ в РБТЛ *in vitro* апробирована и внедрена в ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси» (акт о практическом использовании результатов исследования от 20.02.2015 г.) и используется в структурном подразделении организации, аккредитованной на проведение доклинических исследований.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

Статьи в журналах, включенных в «Перечень научных изданий Республики Беларусь для опубликования результатов диссертационных исследований»

1. Лукашов, Р.И. Влияние комплекса биологически активных веществ цветков рудбекии шершавой на показатели тимуса крыс / Р.И. Лукашов, Д.В. Моисеев // Вестник фармации. – 2013. – № 1. – С. 50–56.

2. Лукашов, Р.И. Внешние и анатомо-диагностические признаки цветков рудбекии шершавой / Р.И. Лукашов, Д.В. Моисеев // Вестник фармации. – 2013. – № 3. – С. 70–74.

3. Лукашов, Р.И. Иммуностропная активность цветков рудбекии шершавой (*Rudbeckia hirta* L.) / Р.И. Лукашов, Д.В. Моисеев // Рецепт. – 2013. – № 4. – С. 96–103.

4. Лукашов, Р.И. Острая токсичность комплекса биологически активных веществ цветков рудбекии шершавой / Р.И. Лукашов, Д.В. Моисеев // Вестник фармации. – 2013. – № 4. – С. 62–68.

5. Лукашов, Р.И. Количественное определение флавоноидов и гидроксикоричных кислот в цветках рудбекии шершавой / Р.И. Лукашов, Д.В. Моисеев // Рецепт. – 2013. – № 5. – С. 95–105.

6. Лукашов, Р.И. Фенольные соединения рудбекии шершавой цветков и их иммуностропная активность / Р.И. Лукашов, Д.В. Моисеев // Вестник Витебск. гос. мед. ун-та. – 2015. – № 4. – С. 118–124.

Материалы конференций

7. Лукашов, Р.И. Изучение флавоноидного комплекса *Rudbeckia hirta* L. методом ВЭЖХ / Р.И. Лукашов // Студенческая медицинская наука XXI века : материалы X междунар. науч.-практ. конф., Витебск, 4–5 нояб. 2010 г. / Витебск. гос. мед. ун-т ; редкол.: С.А. Сушков [и др.]. – Витебск, 2010. – С. 168–169.

8. Лукашов, Р.И. Флавоноиды – антиоксиданты *Rudbeckia hirta* L. / Р.И. Лукашов, Д.В. Моисеев // Роль физиологии и биохимии в интродукции и селекции овощных, плодово-ягодных и лекарственных растений : материалы Междунар. науч.-метод. конф., посвящ. 130-летию со дня рождения проф. С.И. Жегалова и 80-летию со дня создания лабор. физиологии и биохимии растений ВНИИССОК, Москва, 25 февр. 2011 г. / ВНИИССОК ; оргком.: П.А. Чекмарев [и др.]. – М., 2011. – С. 237–240.

9. Лукашов, Р.И. Определение иммуномодулирующей активности водных извлечений из цветков *Rudbeckia hirta* L. в реакции бластотрансформации лейкоцитов (РБТЛ) / Р.И. Лукашов, Д.В. Моисеев // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации : материалы 67-ой науч. сессии сотрудников ун-та, Витебск, 2–3 февр. 2012 г. / Витебск. гос. мед. ун-т ; редкол.: В.П. Дейкало [и др.]. – Витебск, 2012. – С. 282–283.

10. Лукашов, Р.И. Цветки рудбекии шершавой как перспективный вид лекарственного растительного сырья / Р.И. Лукашов, Д.В. Моисеев // Белорусские лекарства : материалы междунар. науч.-практ. конф., Минск, 22–23 нояб. 2012 г. / Ин-т биоорг. химии НАН Беларуси ; редкол.: С.А. Усанов, П.Т. Петров. – Минск, 2012. – С. 139–141.

11. Лукашов, Р.И. Влияние экстракта из цветков рудбекии шершавой на синтез иммуноглобулинов культурой лимфоцитов *in vitro* / Р.И. Лукашов // Актуальные вопросы современной медицины и фармации : материалы 65-ой итоговой науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых, Витебск, 24–25 апр. 2013 г. / Витебск. гос. мед. ун-т ; редкол.: С.А. Сушков [и др.]. – Витебск, 2013. – С. 384.

12. Лукашов, Р.И. Возможности применения комплекса биологически активных соединений спиртового экстракта цветков рудбекии шершавой как модулятора гуморального звена системы иммунитета / Р.И. Лукашов // Биологически активные вещества растений – изучение и использование : материалы междунар. конф., Минск, 29–31 мая 2013 г. / Центр. бот. сад НАН Беларуси ; редкол.: В.Н. Решетников [и др.]. – Минск, 2013. – С. 146–147.

13. Лукашов, Р.И. Температурный режим сушки цветков рудбекии шершавой / Р.И. Лукашов // Студенческая медицинская наука XXI века : материалы XIII-ой междунар. науч.-практ. конф., Витебск, 14–15 нояб. 2013 г. / Витебск. гос. мед. ун-т ; редкол.: С.А. Сушков [и др.]. – Витебск, 2013. – С. 194–195.

14. Лукашов, Р.И. Фенольный состав настойки рудбекии шершавой и его иммунофармакологические свойства / Р.И. Лукашов // Молодежь в науке – 2013 : материалы междунар. науч. конф., Минск, 19–22 нояб. 2013 г. / НАН Беларуси ; оргком.: А.И. Иванец [и др.]. – Минск, 2013. – С. 755–758.

15. Лукашов, Р.И. Антирадикальная активность спиртовых извлечений из цветков рудбекии шершавой / Р.И. Лукашов, Д.В. Моисеев // Достижения фундаментальной, клинической медицины и фармации : материалы 69-ой науч. сессии

сотрудников ун-та, Витебск, 29–30 янв. 2014 г. / Витебск. гос. мед. ун-т ; редкол.: В.П. Дейкало [и др.]. – Витебск, 2014. – С. 187.

16. Лукашов, Р.И. Антимикробный эффект комплекса биологически активных веществ цветков рудбекии шершавой / Р.И. Лукашов, Д.В. Моисеев // Меди-ко-социальная экология личности: состояние и перспективы : материалы XII Междунар. конф., Минск, 11–12 апр. 2014 г. / Бел. гос. ун-т ; редкол.: В.А. Прокашева [и др.]. – Минск, 2014. – С. 57–60.

17. Лукашов, Р.И. Обоснование сроков годности цветков рудбекии шершавой / Р.И. Лукашов // Молодая фармация – потенциал будущего : сб. материалов IV Всерос. науч. конф. студентов и аспирантов с междунар. участ., Санкт-Петербург, 14–15 апр. 2014 г. / Санкт-Петерб. гос. хим.-фарм. акад. ; редкол.: И.А. Наркевич [и др.]. – СПб, 2014. – С. 489–492.

18. Лукашов, Р.И. Экспериментально-теоретическое обоснование выбора группы действующих веществ рудбекии шершавой цветков / Р.И. Лукашов // Минский консилиум – 2014 : сб. материалов респ. науч.-практ. конф. молодых ученых с междунар. участ., Минск, 10–11 июня 2014 г. / Бел. мед. акад. последиплом. образов. ; редкол.: Ю.Е. Демидчик [и др.]. – Минск, 2014. – С. 146–148.

19. Лукашов, Р.И. Определение сроков заготовки рудбекии шершавой цветков (*Rudbeckia hirta flores*) / Р.И. Лукашов, Д.В. Моисеев // Инновации в здоровье нации : сб. материалов II Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участ., Санкт-Петербург, 17 нояб. 2014 г. / Санкт-Петерб. гос. хим.-фарм. акад. – СПб, 2014. – С. 443–445.

Тезисы доклада

20. Лукашов, Р.И. Стандартизация цветков рудбекии шершавой (*Rudbeckia hirta L.*) / Р.И. Лукашов, Д.В. Моисеев // Актуальные вопросы создания новых лекарственных средств : материалы Всеукраин. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых, Харьков, 19–20 апр. 2012 г. : в 2 т. / Нац. фармацевт. ун-т ; редкол.: В.П. Черных [и др.]. – Харьков, 2012. – Т. 1. – С. 90.

Материалы фармакопейной статьи

21. Рудбекии шершавой цветки // Новости экспертизы и регистрации. – 2014. – Т. 5. – С. 26–30.

Патент

22. Иммуномодулирующее средство: пат. 19467 Респ. Беларусь, МПК А 61К 36/28, А 61Р 37/02 / Д.В. Моисеев, Р.И. Лукашов; заявитель Витебск. гос. мед. ун-т. – № а 20120922; заявл. 14.06.12; опубл. 30.08.15 // Афіцыйны бюл. / Нац. цэнтр інтэлектуал. уласнасці. – 2015. – № 4. – С. 64.

РЭЗІЮМЭ

Лукашоў Раман Ігаравіч

Стандартызацыя, хімічны склад і фармакалагічная актыўнасць кветак рудбекіі шурпатай (*Rudbeckia hirta* L.)

Ключавыя словы: рудбекіі шурпатай кветкі, фенольныя злучэнні, флаваноіды, гідраксікарычныя кіслоты, вадкасная храматаграфія, спектрафотаметрыя, паказчыкі якасці, імунатропнае дзеянне.

Мэта работы: распрацаваць методыкі храматаграфічнага і спектрафотаметрычнага вызначэння фенольных злучэнняў, эксперыментальна абгрунтаваць паказчыкі якасці і правесці даклінічную ацэнку бяспекі і фармакалагічнага дзеяння рудбекіі шурпатай кветак (*Rudbeckia hirta flores*).

Метады даследавання і выкарыстаная апаратура: храматаграфія, спектрафотаметрыя, бласттрансфармацыя лімфацытаў, вадкасны храматограф Agilent 1100, рэгіструючы спектрафотометр Specord 250, шалі аналітычныя электронныя Adventurer, мікраскоп Leica PFC 295.

Атрыманыя вынікі і іх навізна: устаноўлены аптымальныя ўмовы экстракцыі флаваноідаў і гідраксікарычных кіслот з рудбекіі шурпатай кветак, на аснове чаго ўпершыню распрацаваны і валідыраваны методыкі колькаснага вызначэння біялагічна актыўных рэчываў рудбекіі шурпатай кветак. Устаноўлены паказчыкі якасці рудбекіі шурпатай кветак. Выяўлены перыяды нарыхтоўкі і тэмпература сушкі, на якія прыходзіцца максімальнае ўтрыманне флаваноідаў і гідраксікарычных кіслот, а таксама ацэнена стабільнасць рудбекіі шурпатай кветак. Даказаны адсутнасць вострай і падвострай таксічнасці рудбекіі шурпатай кветак і наяўнасць у іх тымусапратэктарных, імунатропных і антырадыкальных уласцівасцяў.

Рэкамендацыі па выкарыстанні: эксперыментальна атрыманыя паказчыкі якасці рудбекіі шурпатай кветак уключаны ў матэрыялы фармакапейнага артыкула на гэтую сыравіну. Вынікі даследавання выкарыстоўваюцца ў лабараторыі стандартызацыі і кантролю якасці лекавых сродкаў, у адукацыйным працэсе, у навукова-даследчых інстытутах.

Вобласць прымянення: фармацэўтычны аналіз, фармакалогія, імуналогія.

РЕЗЮМЕ

Лукашов Роман Игоревич

Стандартизация, химический состав и фармакологическая активность цветков рудбекии шершавой (*Rudbeckia hirta* L.)

Ключевые слова: рудбекии шершавой цветки, фенольные соединения, флавоноиды, гидроксикоричные кислоты, жидкостная хроматография, спектрофотометрия, показатели качества, иммуностропное действие.

Цель работы: разработать методики хроматографического и спектрофотометрического определения фенольных соединений, экспериментально обосновать показатели качества и провести доклиническую оценку безопасности и фармакологического действия рудбекии шершавой цветков (*Rudbeckia hirta flores*).

Методы исследования и использованная аппаратура: хроматография, спектрофотометрия, бласттрансформация лимфоцитов, жидкостный хроматограф Agilent 1100, регистрирующий спектрофотометр Specord 250, весы аналитические электронные Adventurer, микроскоп Leica PFC 295.

Полученные результаты и их новизна: установлены оптимальные условия экстракции флавоноидов и гидроксикоричных кислот из рудбекии шершавой цветков, на основании чего впервые разработаны и валидированы методики количественного определения биологически активных веществ рудбекии шершавой цветков. Установлены показатели качества рудбекии шершавой цветков. Выявлены периоды заготовки и температура сушки, на которые приходится максимальное содержание флавоноидов и гидроксикоричных кислот, а также оценена стабильность рудбекии шершавой цветков. Доказаны отсутствие острой и подострой токсичности рудбекии шершавой цветков и наличие у них тимусопротекторных, иммуностропных и антирадикальных свойств.

Рекомендации по использованию: экспериментально установленные показатели качества рудбекии шершавой цветков включены в материалы фармакопейной статьи на данное сырье. Результаты исследования используются в лаборатории стандартизации и контроля качества лекарственных средств, в образовательном процессе, в научно-исследовательских институтах.

Область применения: фармацевтический анализ, фармакология, иммунология.

SUMMARY

Lukashou Raman Igaravich

Standardization, the chemical composition and pharmacological activity of flowers of black-eyed susan (*Rudbeckia hirta* L.)

Key words: black-eyed susan flowers, phenolic compounds, flavonoids, hydroxycinnamic acids, liquid chromatography, spectrophotometry, quality indicators, immunotropic action.

Aim of the study: to develop the techniques of chromatographic and spectrophotometric determination of phenolic compounds, to prove the quality indicators experimentally and to conduct preclinical evaluation of safety and pharmacological action of black-eyed susan flowers (*Rudbeckia hirta* flores).

Methods of the research and used equipment: chromatography, spectrophotometry, blast transformation of lymphocytes, liquid chromatograph Agilent 1100, recording spectrophotometer Specord 250, analytical electronic scales Adventurer, microscope Leica PFC 295.

Results of the research and its novelty: the optimal conditions of extraction of flavonoids and hydroxycinnamic acids from black-eyed susan flowers have been defined. On the basis of this for the first time the techniques of quantitative determination of biologically active substances of black-eyed susan flowers have been developed and validated. The quality indicators of black-eyed susan flowers have been established. We have identified the periods of collection and drying temperature when the maximum content of flavonoids and hydroxycinnamic acids is observed as well as have evaluated the stability of black-eyed susan flowers. The absence of acute and subacute toxicity of black-eyed susan flowers and the presence of its thymus protective, immunotropic and antiradical properties have been proved.

Recommendations for use: experimentally determined quality indicators of black-eyed susan flowers have been included in the pharmacopoeial article on this medicinal plant raw material. The results of the research are used in the laboratory of standardization and quality control of drugs, in the educational process, in the research institutes.

Fields of application: pharmaceutical analysis, pharmacology, immunology.



Подписано в печать 24.12.2015 г. Формат 60×84/16.
Бумага типографская №2. Гарнитура Times. Усл. печ. листов 1,45.
Уч.-изд. л. 1,56. Тираж 60 экз. Заказ №1267.
Издатель и полиграфическое оформление:
УО «Витебский государственный медицинский университет».
ЛП № 02330/453 от 30.12.2013
Пр-т Фрунзе, 27, 210023, Витебск