

На правах рукописи

ХУСАИНОВА АЛИЯ ИЛЬЯСОВНА

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ЦВЕТКОВ ПИЖМЫ ОБЫКНОВЕННОЙ (*TANACETUM VULGARE L.*)**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Самара – 2015

Работа выполнена в государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук *Куркина Анна Владимировна*

Официальные оппоненты:

Пупыкина Кира Александровна – доктор фармацевтических наук, профессор, государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии, профессор кафедры

Буланова Анджела Владимировна – доктор химических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный университет», кафедра физической химии и хроматографии, профессор кафедры

Ведущая организация:

государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Курск

Защита состоится 4 июня в 13:00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (<http://www.samsmu.ru/science/referats>) государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан « » _____ 2015 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук,
доцент

Петрухина Ирина Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время при лечении многих хронических заболеваний широко применяются препараты на основе лекарственного растительного сырья (ЛРС). Современные фитопрепараты, как правило, сочетают в себе высокую эффективность, относительную безопасность и широту терапевтического действия (Киселева Т.Л. и др., 2008; Куркин В.А., 2007; Самылина И.А. и др. 2003; 2010). Это стало возможным благодаря разработке более совершенных способов выделения целевых действующих веществ и методов стандартизации лекарственного сырья, субстанций и фитопрепаратов. Однако многие лекарственные растения (ЛР) остаются недостаточно изученными в плане химического состава, фармакологических свойств, стандартизации (Самылина И.А. и др., 1995; Киселева Т.Л. и др., 2008; Куркин В.А., 2002; 2007). В полной мере это относится к цветкам пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.) и препаратам на их основе, в частности «Желчегонному сбору № 3» («Фитогепатол № 3»), активно применяемого в настоящее время в качестве желчегонного средства в комплексной терапии заболеваний печени и желчного пузыря (Машковский М.Д., 2012; Государственный реестр лекарственных средств, 2014).

На сегодняшний день в фармакопейной статье (ФС) на цветки пижмы обыкновенной (Государственная фармакопея СССР XI издания, ФС 11) отсутствует раздел «Качественные реакции». В разделе «Количественное определение» приводится методика определения суммы флавоноидов и фенолкарбоновых кислот методом прямой спектрофотометрии, не позволяющая дифференцировать флавоноиды как группу биологически активных соединений (БАС), которые определяют основное фармакологическое действие. В разделе «Микроскопия» отсутствует морфолого-анатомическое описание органов, имеющих диагностическое значение при идентификации цветков и составляющих сырья пижмы обыкновенной. Также не приводится описание диагностических признаков порошка цветков пижмы обыкновенной.

В нормативной документации (НД) на «Желчегонный сбор № 3» (Временная фармакопейная статья (ВФС) 42-2558-95) определение качества ведется по содержанию эфирного масла и не предлагается методика

количественного определения содержания БАС, оказывающих основное фармакологическое действие, а именно флавоноидов.

Представленные в НД на цветки пижмы обыкновенной и «Желчегонный сбор № 3» методы определения качества, не соответствуют современным требованиям, предъявляемым к стандартизации ЛРС и фитопрепаратов (Отраслевой стандарт 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения»). В тоже время для извлечений из пижмы обыкновенной выявлена диуретическая активность с тенденцией к калийсберегающему эффекту, что открывает перспективы для создания отечественных диуретических фитопрепаратов на основе данного растения. Как известно, многие мочегонные средства повышают выведение калия и могут приводить к гипокалиемии («Фуросемид», «Торасемид», «Буфетамид»), поэтому важной задачей является разработка калийсберегающих растительных средств.

Степень разработанности темы. Вопросами изучения пижмы обыкновенной занималось большое количество исследователей. Я. Неедра, И.Я. Гуревич, В.С. Тали, А.Я. Полле, Р.Г. Оводова, А.И. Яковлева провели изучение химического состава. Я. Неедра, И.Я. Гуревич, Н.С. Игнатьева, М.И. Соловьева, В.Г. Казанцева, А.И. Багинска, А.К. Колхир исследовали фармакологическую активность цветков и препаратов пижмы обыкновенной. В.С. Тали, Н.С. Игнатьевой, И.А. Самылиной и О.Г. Аносовой (Потаниной) проведено анатомо-морфологическое исследование. К.Б. Адиходжаева, Г.Н. Российская, Р.В. Якучевич разработали препараты на основе пижмы обыкновенной и методы определения их качества. Проблемами стандартизации занимались также Л.С. Баслинов, О.В. Евдокимова, А.Н. Кузьменко. Однако, несмотря на многолетний опыт изучения цветков пижмы обыкновенной, вопросы стандартизации сырья и препаратов данного растения решены не в полной мере.

Таким образом, актуальным является углубленное фармакогностическое исследование цветков пижмы обыкновенной, изучение применяемого лекарственного средства на их основе – «Желчегонного сбора № 3» («Фитогепатол № 3»), а также разработка новых лекарственных препаратов.

Цель работы и основные задачи исследования. Целью настоящей работы является фармакогностическое исследование цветков пижмы

обыкновенной, направленное на разработку и совершенствование методов стандартизации сырья и лекарственных препаратов на основе данного растения.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

1. Проведение морфолого-анатомического исследования цельного, измельченного сырья, а также порошка цветков пижмы обыкновенной.
2. Апробирование методики выявления диагностических признаков порошка цветков пижмы обыкновенной в рамках сравнительного морфолого-анатомического исследования с порошком цветков бессмертника песчаного.
3. Проведение фитохимического исследования цветков пижмы обыкновенной.
4. Разработка методики качественного анализа и количественного определения суммы флавоноидов в цветках пижмы обыкновенной.
5. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов «Желчегонного сбора № 3».
6. Обоснование состава и технологии новых лекарственных средств (ЛС) на основе цветков пижмы обыкновенной («Пижмы настойка», «Пижмы цветков сироп»).
7. Разработка методики качественного и количественного анализа лекарственных препаратов (ЛП) «Пижмы настойка», «Пижмы цветков сироп».
8. Определение показателей качества разработанных ЛП «Пижмы настойка», «Пижмы цветков сироп».
9. Разработка проектов НД на цветки пижмы обыкновенной, ЛП «Пижмы настойка», «Пижмы цветков сироп».
10. Проведение фармакологических исследований по изучению влияния экспериментальных лекарственных препаратов на основе цветков пижмы обыкновенной на экскреторную функцию почек крыс.

Научная новизна. В результате фитохимических исследований из цветков пижмы обыкновенной получены и идентифицированы следующие соединения: флавоноиды – акацетин, тилианин, апигенин, космосиин, а также хлорогеновая кислота. Важно, что космосиин и тилианин впервые выделены из цветков пижмы обыкновенной, произрастающей на территории Самарской области. Определено, что тилианин является доминирующим флавоноидом цветков пижмы обыкновенной.

Разработаны методические и методологические подходы к стандартизации сырья пижмы обыкновенной и «Желчегонного сбора № 3», заключающиеся в оценке содержания суммы флавоноидов с использованием тонкослойной хроматографии (ТСХ) и дифференциальной спектрофотометрии.

Показана возможность использования газожидкостной хроматографии (ГЖХ) для определения подлинности сырья и препаратов пижмы обыкновенной путем построения диаграмм-образов, основанных на индексах удерживания летучих компонентов. Диаграммы-образы позволяют идентифицировать цветки пижмы обыкновенной и препараты на их основе.

Проведено комплексное морфолого-анатомическое исследование порошка соцветий пижмы обыкновенной. Предложена методика выявления диагностических признаков порошка, позволяющая идентифицировать и подтверждать подлинность пижмы обыкновенной.

Исследование морфолого-анатомического строения порошка цветков пижмы обыкновенной и порошка цветков бессмертника песчаного позволило выявить диагностические признаки порошкованного сырья указанных растений. Это дает возможность достоверно определять выявленные признаки в желчегонных сборах.

Обоснованы состав и способ получения новых ЛП «Пижмы настойка», «Пижмы цветков сироп», обладающих диуретическими свойствами.

Разработаны методы контроля качества указанных ЛП «Пижмы настойка», «Пижмы цветков сироп» с использованием подходов гармонизации, применяемые в современной стандартизации.

Практическая значимость. Переработан и дополнен раздел «Микроскопия», разработан раздел «Качественные реакции» (ТСХ-метод и метод спектроскопии), усовершенствован раздел «Количественное определение» (дифференциальная спектрофотометрия), включенные в проект фармакопейной статьи на ФС «Пижмы цветки».

Предложены методики качественного и количественного анализа, определены показатели качества, которые нашли отражение в разработанных и принятых на рассмотрение ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» ФС «Пижмы цветки» (вх. № 1023 от 28.01.2013 г.) с целью включения в Государственную Фармакопею Российской Федерации XII издания.

Разработаны методики количественного анализа «Желчегонного сбора № 3», основанные на определении суммы флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии. Разработаны состав, способ получения лекарственных препаратов на основе пижмы обыкновенной: «Пижмы настойка», «Пижмы цветков сироп». Определены показатели качества указанных препаратов. Разработаны методики качественного и количественного анализа действующих веществ в разработанных лекарственных формах, отвечающие принципам унификации, предъявляемым к современному фармацевтическому анализу (Самылина И.А. и др. 1994; 2006).

Результаты диссертационных исследований используются в учебном процессе на кафедрах фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, фармацевтической технологии, управления и экономики фармации, химии фармацевтического факультета ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России, ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», ЗАО «Самаралектравы».

Связь задач исследования с планами научных работ.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по теме: «Комплексные исследования по проблеме создания новых лекарственных препаратов природного и синтетического происхождения» (№ Государственной регистрации 01200900658), а также соответствует тематике Проблемной комиссии по химико-фармацевтическим наукам ГБОУ ВПО СамГМУ Минздрава России.

Положения, выдвигаемые на защиту.

1. Результаты анатомо-морфологических исследований порошка цветков пижмы обыкновенной.
2. Результаты апробирования методики выявления диагностических признаков порошка пижмы обыкновенной при сравнительном анатомо-морфологическом исследовании с порошком цветков бессмертника песчаного.
3. Результаты фитохимического изучения цветков пижмы обыкновенной.

4. Результаты исследований по разработке методов стандартизации цветков пижмы обыкновенной.
5. Результаты исследований по разработке методики количественного определения содержания суммы флавоноидов в «Желчегонном сборе № 3».
6. Результаты исследований по разработке способов получения ЛП на основе пижмы обыкновенной «Пижмы настойка», «Пижмы цветков сироп».
7. Результаты исследований по разработке методик качественного анализа и количественного определения разработанных ЛП («Пижмы настойка», «Пижмы цветков сироп»).
8. Данные по изучению показателей качества предлагаемых ЛП «Пижмы настойка», «Пижмы цветков сироп».
9. Результаты исследований диуретической активности разработанных ЛП («Пижмы настойка», «Пижмы цветков сироп»).

Апробация работы. Материалы работы доложены и обсуждены на IV Всероссийском научно-практическом семинаре «Современные проблемы медицинской химии. Направленный поиск новых лекарственных средств» (г. Волгоград, 2012); Всеукраинской научно-практической конференции студентов и молодых ученых «Актуальные вопросы создания новых лекарственных средств» (Харьков, 2012); XVIII Всероссийском конгрессе «Экология и здоровье человека» (г. Самара, 2013); XI Международной конференции «Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы» (г. Минск, 2013); IV Всероссийской научной конференции «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, 2014); конференциях дипломированных специалистов «Аспирантские чтения «Молодые ученые – медицине» (г. Самара, 2012; 2013; 2014).

Публикации. Основное содержание диссертации опубликовано в 25 научных работах, из них 8 статей в журналах, включенных в Перечень ВАК Министерства образования и науки РФ.

Личный вклад автора. Все экспериментальные результаты, приведенные в диссертации, получены самим автором. Автором выполнены исследования по изучению анатомо-морфологических особенностей строения различных органов, формирующих порошок пижмы обыкновенной, при этом выявлены основные диагностические признаки. Из цветков пижмы обыкновенной выделены и идентифицированы хлорогеновая кислота, тилиалин, космосиин, акацетин и апигенин. Разработаны методы

стандартизации цветков пижмы обыкновенной. Разработан метод количественного определения флавоноидов в «Желчегонном сборе № 3». Предложены состав и технология получения препаратов «Пижмы настойка», «Пижмы цветков сироп», разработаны методики их качественного и количественного анализа. Изучена стабильность препаратов «Пижмы настойка», «Пижмы цветков сироп», определены основные показатели их качества. Автором разработаны проекты ФС «Пижмы цветки», ФСП «Пижмы настойка».

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 206 страницах машинописного текста, содержит 31 таблицу, 40 рисунков. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания объектов и методов исследования (глава 2), обсуждения результатов собственных экспериментальных исследований (главы 3-6), общих выводов, приложения и списка литературы, включающего 227 источников, из которых 72 – на иностранных языках.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследования, показаны научная новизна и практическая значимость полученных результатов, изложены положения, выносимые на защиту. Первая глава посвящена обзору современного состояния исследований пижмы обыкновенной, в котором обобщены и систематизированы сведения по изучению химического состава, фармакологических свойств, применению в медицине, стандартизации сырья и препаратов на основе данного растения. В главе 2 приведена характеристика объектов и методов исследования. Глава 3 отражает результаты анатомо-морфологического исследования порошка цветков пижмы обыкновенной и апробирования методики выявления диагностических признаков указанного порошка в сравнительном анатомо-морфологическом анализе с порошком цветков бессмертника песчаного. В главе 4 приведены результаты фитохимического исследования цветков пижмы обыкновенной. В главе 5 обсуждаются вопросы стандартизации цветков пижмы обыкновенной и «Желчегонного сбора № 3». Глава 6 посвящена обоснованию целесообразности создания и стандартизации препаратов на основе цветков пижмы обыкновенной.

В Приложение вынесены акты внедрения, проекты ФС «Пижмы цветки», ФСП «Пижмы настойка».

Результаты, полученные при проведении исследований, обработаны статистически и представлены в таблицах, в формулах, на рисунках, которые приведены в тексте диссертации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Объекты и методы исследования

Объектами исследования послужили образцы сырья – цветки пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.), собранные в период с 2007 г. по 2013 г. Образцы сырья заготавливались на территориях различных регионов Российской Федерации: Самарской, Ульяновской, Пензенской, Оренбургской областей, Чувашской Республики. Образцы сырья были собраны в различной фазе вегетации растения в период с июня по сентябрь. Кроме того, объектами исследования служили промышленные образцы цветков пижмы обыкновенной. Исследованию подлежали также лекарственные препараты («Танацехол», «Фитогепатол № 3»), разработанные лабораторные образцы извлечений из ЛРС, индивидуальные вещества, выделенные из цветков пижмы обыкновенной: хлорогеновая кислота, тилианин, космосиин, акацетин, апигенин и государственный стандартный образец (ГСО) цинарозид.

Морфолого-анатомическое исследование проводили с использованием цифровых микроскопов «Motic DM-111», «Motic DM-39» и «Motic DM-1802A» с увеличениями x20, x40, x100, x400, x1000.

Изучение химического состава цветков проводили методом адсорбционной жидкостной колоночной хроматографии с использованием различных сорбентов: силикагель марки L 40/100 мкм и L 100/250 мкм (Чехия), сефадекс LH-20 (Швеция), полиамид марки «Wolem» (Германия). Экстракцию осуществляли хлороформом, смесью хлороформ-этанол в различных соотношениях, спиртом этиловым 95%.

Для анализа извлечений из сырья, субстанций, выделенных веществ и лекарственных препаратов методом тонкослойной хроматографии использовали пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» (Россия) и «Silufol UV 254» (Чехия).

Спектральные исследования проводили на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) в кюветах с толщиной слоя 10 мм. ¹H-ЯМР-спектры регистрировали на приборе «Bruker AM 300 (300 мГц). Масс-спектры электронного удара регистрировали на приборе «Kratos MS-30» при энергии

ионизирующих электронов 70 эВ и варьировании температуры ионного источника от 100 до 250 °С.

Газожидкостную хроматографию (ГЖХ) проводили на приборе «Кристалл 5000.2» (ЗАО «Хроматэк») с пламенно-ионизационным детектором (ПИД). Газом-носителем служил водород, скорость 1 мл/мин. Использовали капиллярные кварцевые колонки VF-1 фирмы Varian, (США) (30м×0,32мм×0,5мкм) с полидиметилсилоксановой неполярной фазой и капиллярную колонку INNOWAX фирмы Agilent Technologies, США (30м×0,32мм×0,5мкм) с полярной неподвижной фазой ПЭГ-20М. Хроматографирование проводили при программировании температуры колонки.

Получение настойки осуществляли методом модифицированной ремацерации. Получение сиропа проводили в соответствии с классическими правилами фармацевтической технологии.

Проводили исследования диуретической активности разработанных ЛП из цветков пижмы обыкновенной.

2. Изучение вопросов диагностики пижмы обыкновенной в измельченном сырье и фармакопейных сборах

Морфолого-анатомическому анализу подвергали фракции измельченного сырья, предварительно просеянного через систему сит различного диаметра (3 мм, 2 мм, 1 мм, 0,25 мм). К основным диагностическим признакам порошка можно отнести характер строения трихом пижмы обыкновенной, которые представлены остатками многоклеточных бичевидных волосков, состоящих из 4–5 последовательно соединенных клеток округлой формы, конечная клетка волоска очень длинная, перекрученная, часто обломанная, а также наличие железок. Они двухрядные, двух-, трехъярусные, 4-6 клеточные, встречаются на всех органах растения, формирующих порошок. Волоски характерны для эпидермиса листьев, цветоноса и листочков обертки. Диагностическими также являются характер поверхности цветоложа, оформленного упорядоченно расположенными местами прикрепления трубчатых цветков округлой формы, в центре которых видны фрагменты проводящих элементов темно-бурого цвета на фоне бесцветных клеток эпидермы, а также лизигенные вместилища, содержащие секрет темно-коричневого цвета в наружном слое паренхимы цветоложа. Хорошо заметна центральная жилка листочков

обертки, сопровождающая секреторные ходы и опушенная бичевидными волосками. У цветков пижмы важно отметить неоднородность клеток эпидермиса на трубке венчика, с многочисленными друзами и отгиб венчика, желтого цвета, представленный пятью вытянутыми зубцами с округлыми верхушками и железистыми трихомами. Завязи цветков также имеют ряд диагностических особенностей: основание завязи, обрамленное тремя-четырьмя рядами склерифицированных клеток; фрагменты мест срастания завязи и венчика с микроскопируемыми там многочисленными друзами, образующими заметное кольцо; локализация эфиромасличных железок – наиболее густо расположенных на завязи и у основания трубочки венчика; мелкозубчатая окраина завязи цветка – хохлатка редуцированной чашечки. Андроцей представлен крупными, двухгнездными, сросшимися теками пыльниками, с заостренными верхушками, заполненными пылью желтого цвета или без нее; длинными тычиночными нитями, бесцветными с заметным проводящим пучком, из двух спиральных сосудов. Гинецей имеет неровную, ворсинчатую поверхность раздвоенного рыльца; крупное кольцо из нектарников желтого цвета, локализованное у основания столбика пестика.

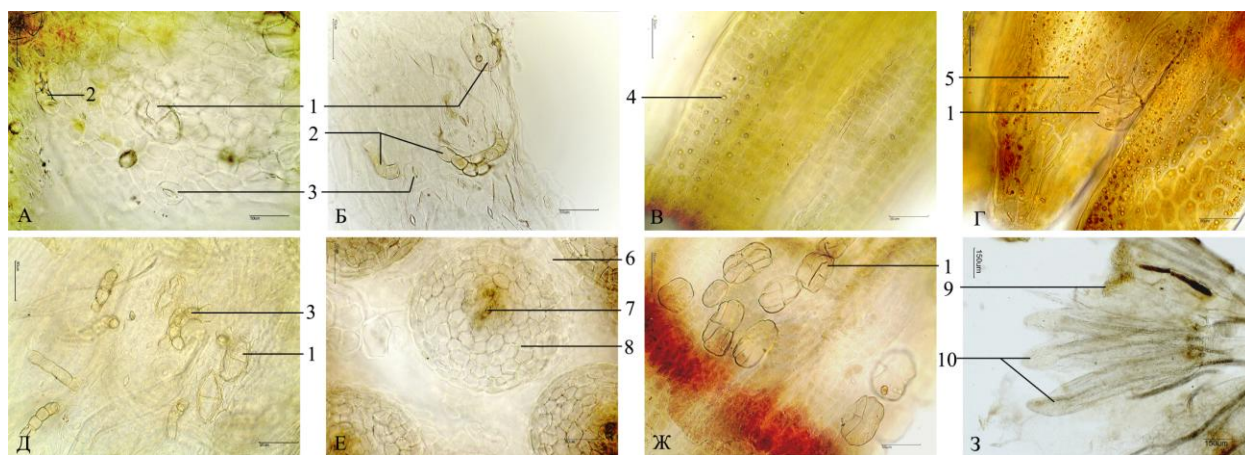


Рис. 1. Диагностические элементы порошка цветков пижмы обыкновенной

Обозначения: А – эпидермис листочка обертки (x400); Б – эпидермис цветоноса (x400); В – эпидермис трубки венчика (x400); Г – отгиб венчика (x400); Д – эпидермис листа (x400); Е – поверхность цветоложа (x400); З – зона сопряжения венчика и завязи; железки завязи (x400); Ж – фертильные части цветка (x100).

1 – железки; 2 – кроющие волоски; 3 – устьица; 4 – клетки эпидермиса с друзами; 5 – клетки эпидермиса с пигментом; 6 – эпидермис цветоложа; 7 – сосуд ксилемы; 8 – эпидермис места прикрепления цветка; 9 – рыльце пестика; 10 – теки пыльников.

По результатам сравнительных исследований фракций порошка соцветий пижмы нами рекомендовано проводить анализ на средних фракциях порошка, проходящих сквозь сито с диаметром пор 2 мм.

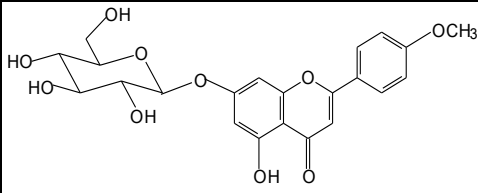
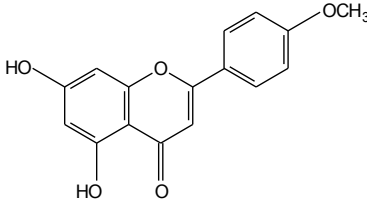
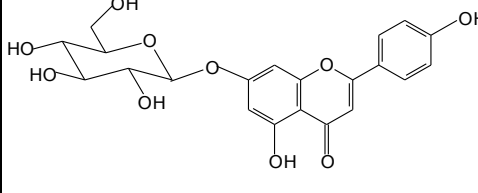
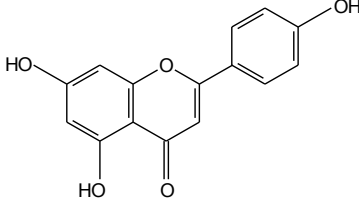
3. Фитохимическое исследование цветков пижмы обыкновенной

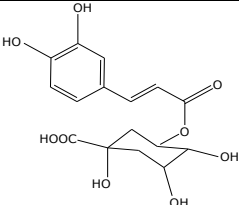
С целью обоснования методик качественного и количественного анализа сырья и препаратов пижмы обыкновенной из цветков данного растения с использованием колоночной хроматографии выделены 5 соединений: флавоноиды 1-4 и хлорогеновая кислота (табл. 1). Для установления химической структуры выделенных флавоноидов нами использованы методы ¹H-ЯМР-, УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии, а также результаты химических превращений.

Тилианин и космосиин впервые выделены из данного растения, при этом тилианин является доминирующим флавоноидом. По своим физико-химическим и спектральным характеристикам тилианин является перспективным веществом в плане использования в качестве рабочего стандартного образца (РСО) в методиках контроля качества сырья и препаратов.

Таблица 1

Физико-химические константы и спектральные характеристики соединений, выделенных из цветков пижмы обыкновенной

№ п/п	Название	Химическая формула	Физико-химические характеристики
1.	Тилианин C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀ 7-О-β-D- глюкопиранозид акацетина		Кристаллы белого цвета, т.пл. 236-239 °С (водный спирт) УФ-спектр: λ _{max} 270 нм, 327 нм (EtOH)
2.	Акацетин C ₁₆ H ₁₂ O ₅ 5,7-дигидрокси- 4 ¹ -метоксифлаво		Кристаллы светло-желтого цвета, т.пл. 264-267 °С (водный спирт). УФ-спектр: λ _{max} 270 нм, 328 нм (EtOH)
3.	Космосиин C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀ 7-О-β-O- глюкопиранозид апигенина		Кристаллы светло-желтого цвета, т.пл. 225-227°С (водный спирт). УФ-спектр: λ _{max} 270 нм, 334 нм (EtOH)
4.	Апигенин C ₁₅ H ₁₀ O ₅ 5,7,4 ¹ - тригидрокси флаво		Кристаллы светло-желтого цвета, т.пл. 340-343 °С (водный спирт). УФ-спектр: λ _{max} 270 нм, 335 (EtOH)

5.	Хлорогеновая кислота $C_{16}H_{18}O_9$ 3-кофеилхинная кислота		Кристаллы бесцветные, т. пл. 206-210 °С. УФ-спектр: λ_{max} 240, 298 и 325 нм (EtOH)
----	---	---	---

При использовании газожидкостной хроматографии получены хроматографические характеристики летучих компонентов, выделяющихся в равновесную паровую фазу из цветков пижмы обыкновенной, из промышленных образцов сырья и из ЛП на ее основе. Получены газохроматографические спектры удерживания летучих компонентов для этих объектов, включающие совокупность индексов удерживания Ван-ден-Доола и Кратца в диапазоне от 453 ± 5 до 1129 ± 1 , для колонки с неполярной и от 574 ± 8 до 1569 ± 2 (табл. 2) для колонки с полярной неподвижными фазами.

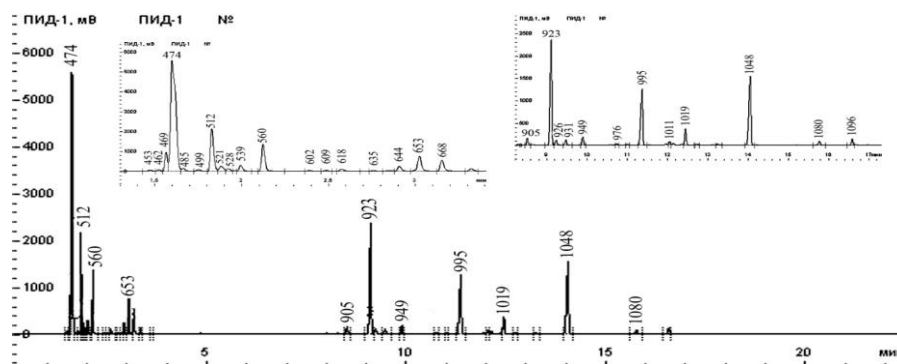


Рис. 2. Хроматограмма летучих компонентов равновесной паровой фазы цветков пижмы обыкновенной. Капиллярная колонка VF-1, линейное программирование температуры (40-200°C), 5°/мин, газ-носитель – водород

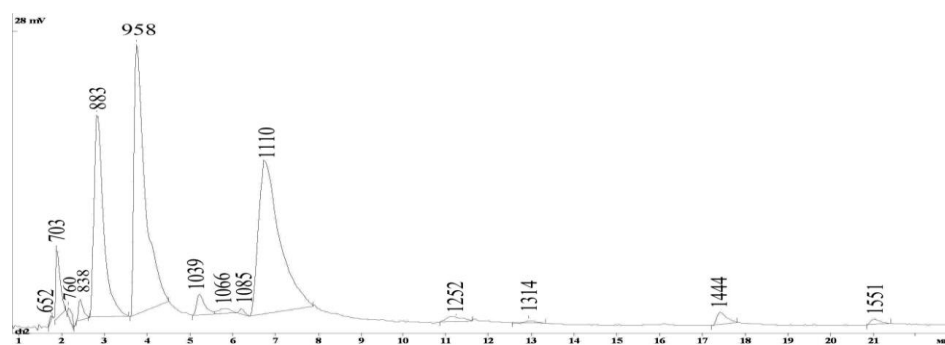


Рис. 3. Хроматограмма летучих компонентов равновесной паровой фазы цветков пижмы обыкновенной. Капиллярная кварцевая колонка INNOWAX, линейное программирование температуры (40-180°C), 4°/мин, газ-носитель – водород

На основании определения основных летучих компонентов каждого из объектов исследования, относительное содержание которых $A_{i,отн.} \geq 0,2\%$, построены диаграммы-образы для идентификации исследуемых объектов и

оценки их подлинности. Показано близкое соответствие диаграмм летучих компонентов цветков и промышленных образцов сырья для колонки с неполярной неподвижной фазой.

Установлено, что летучие компоненты цветков и промышленных образцов сырья имеют близкий состав, а многие летучие компоненты препаратов отсутствуют (табл. 2), что связано, на наш взгляд, с особенностью технологии получения и, следовательно, с их химическим компонентным составом.

Таблица 2

Хроматографические спектры удерживания летучих компонентов равновесной паровой фазы цветков и препаратов пижмы обыкновенной, полученные на колонке с неполярной неподвижной фазой

I_i^T	А отн i %					I_i^T	А отн i %				
	Цветки пижмы	Пачка 50 г	Фильтр-пакеты	Настой-ка	Танацехол		Цветки пижмы	Пачка 50 г	Фильтр-пакеты	Настой-ка	Танацехол
453±5	0,20	0,34	0,40		0,91	923±2	15,12	2,44	1,00		
462±5	0,23	0,43	0,38			926±2	0,82	0,40			
469±5	1,76	5,52	2,21			931±2	0,85	1,92			
474±5	23,33	13,46	11,14	26,93	72,96	936±2		8,53	8,04		
485±5	0,36	0,51	0,42		2,21	941±2		0,09			
499±5	0,30	3,95			0,94	946±2		0,11			
512±5	6,42	4,92	10,78			949±2	1,29	3,38	5,00		
521±5	0,97	0,37	1,87	25,18		952±2		0,39	0,55		
528±5	0,44	0,43	0,48			971±1		0,39	0,51	1,27	
539±5	0,868	0,76	0,45		1,27	976±1	0,26	1,13	0,83		
560±5	4,088	10,56	9,37			991±1		0,50			
574±5				8,94		995±1	11,49	0,68			
602±3	0,15	0,25	0,29		3,31	1003±1		0,72		2,63	0,93
609±3	0,13	0,34	0,31			1009±1		1,07	0,73		
618±3	0,43	1,48	0,70	6,81		1011±1	0,56	2,11	1,13		0,22
635±3	0,13	0,14		2,69	1,44	1016±1		0,99	0,49		
644±3	0,85	3,89	4,68		1,98	1019±1	3,01	8,46	9,66	2,23	
653±3	2,74	7,63	6,53		11,33	1030±1		0,88		1,66	
668±3	2,13		0,36			1033±1		0,81			0,24
682±3	0,49		0,19			1039±1				1,90	
692±3				2,39		1048±1	17,06			0,61	
738±2			0,16		0,13	1062±1			0,73		
750±2			0,24		0,16	1065±1		1,16	6,19		
775±2			0,21		0,25	1069±1					0,21
799±2			0,49		0,28	1080±1	0,83	2,20	3,48		
829±2			0,13		0,18	1096±1	1,22				
905±2	1,04	2,12	0,24			1129±1			7,91		

В качестве маркеров цветков пижмы обыкновенной предложено использовать три компонента с наибольшим содержанием в паровой фазе ($A_{i,отн.} = 23,33\%, 15,1\%, 17,06\%$, с I_i^T на неполярной фазе: 474, 923, 1048).

4. Совершенствование методов контроля качества цветков и препаратов пижмы обыкновенной

Согласно ОСТ 91500.05.001-00 разработаны методики определения подлинности и количественного анализа суммы флавоноидов цветков пижмы обыкновенной.

4.1. Качественный анализ цветков пижмы обыкновенной

Для оценки подлинности цветков пижмы обыкновенной предложен метод ТСХ-анализа с определением доминирующего флавоноида тилианина в сочетании со спектральными характеристиками спиртового раствора водно-спиртового извлечения из цветков пижмы обыкновенной. При отсутствии тилианина возможно использование ГСО цинарозида (с величиной R_s около 1,2 относительно пятна тилианина).

ТСХ-анализ проводят в системе хлороформ-этанол-вода (26:16:3). Детекцию проводят в УФ-свете при длине волны 254 нм и 366 нм. На хроматограмме обнаруживается флуоресцирующее пятно фиолетового цвета (254 нм) или желтого цвета (366 нм) с величиной R_f около 0,7 (тилианин) (рис. 4) и величиной R_s около 1,2 относительно пятна ГСО цинарозида. Затем хроматограмму проявляют щелочным раствором диазобензолсульфокислоты и нагревают при 100-105 °С. При этом пятно тилианина приобретает желтую окраску.

Ультрафиолетовый спектр водно-спиртового извлечения из цветков пижмы обыкновенной в области от 100 нм до 500 нм имеет основной максимум поглощения при длине волны 332 нм ± 3 нм, а также «плечо» в области 246 нм ± 3 нм и 290 нм ± 3 нм (гидроксикоричные кислоты) (рис. 5).

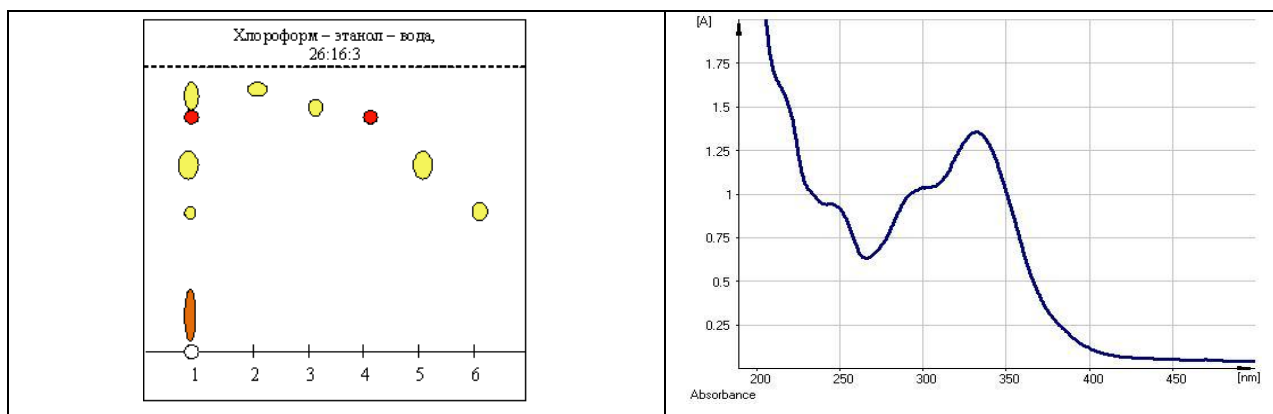


Рис. 4. Схема тонкослойной хроматограммы веществ и водно-спиртового извлечения из цветков пижмы обыкновенной

Обозначения: 1 – водно-спиртовое извлечение из сырья; 2 – акацетин (2); 3 – апигенин (4); 4 – соединение 5; 5 – тилианин (1); 6 – космосин (3).

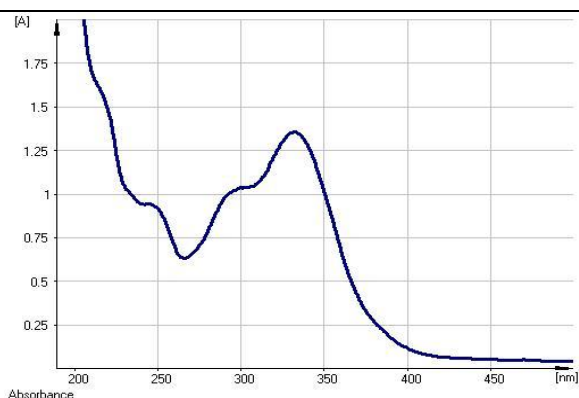


Рис. 5. УФ-спектр растворов водно-спиртового извлечения из цветков пижмы обыкновенной

4.2. Количественное определение содержания суммы флавоноидов цветков пижмы обыкновенной

Количественное определение суммы флавоноидов в цветках пижмы обыкновенной проводят методом дифференциальной спектрофотометрии в присутствии ГСО цинарозида при аналитической длине волны 400 нм (рис. 6). Рекомендован новый числовой показатель «Содержание флавоноидов» – не менее 1,5 %. Определено, что оптимальными условиями экстракции сырья являются: экстрагент – спирт этиловый 70 %, соотношение «сырье-экстрагент» – 1:50, время экстракции – 60 мин.

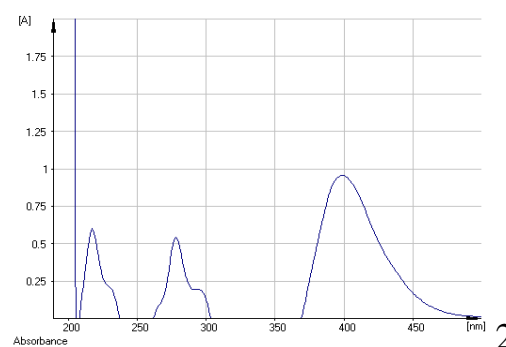
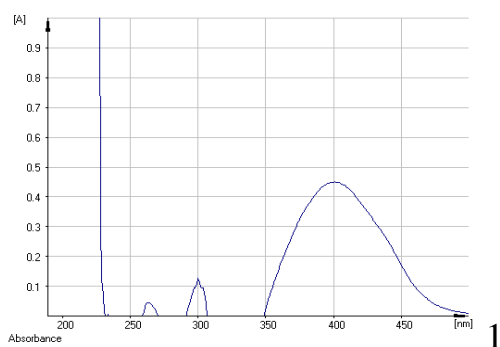


Рис. 6. Дифференциальные спектры исследуемых растворов

Обозначения: 1 – водно-спиртовое извлечение из цветков пижмы обыкновенной; 2 – спиртовой раствор ГСО цинарозида.

Ошибка единичного определения суммы флавоноидов в цветках пижмы обыкновенной с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 3,90\%$ (табл. 3).

4.3. Совершенствование подходов к стандартизации препаратов пижмы обыкновенной

Количественное определение содержания суммы флавоноидов в «Желчегонном сборе № 3» проводят методом дифференциальной спектрофотометрии в присутствии ГСО цинарозида, при аналитической длине волны 400 нм (рис. 7). Рекомендован числовой показатель «Содержание флавоноидов» – не менее 1 %. Определены оптимальными условиями экстракции сырья являются: экстрагент – спирт этиловый 70 %, соотношение «сырье-экстрагент» – 1:30, время экстракции – 60 мин.

Ошибка единичного определения суммы флавоноидов в «Желчегонном сборе № 3» с доверительной вероятностью 95 % составляет $\pm 3,73\%$ (табл. 3).

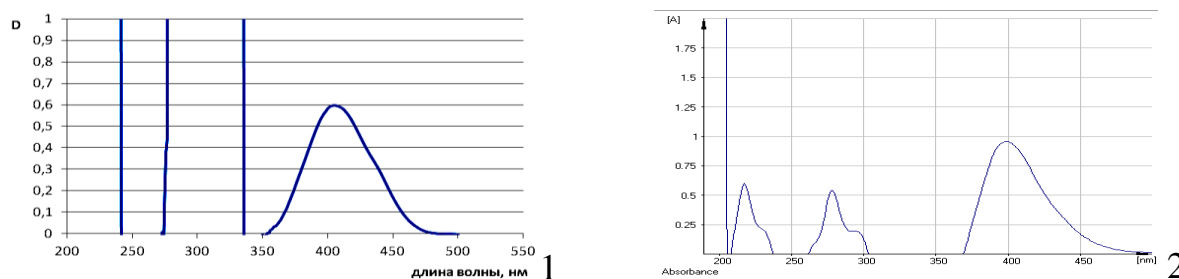


Рис. 7. Дифференциальные спектры поглощения исследуемых растворов
 Обозначения: 1 – водно-спиртовое извлечение из модельной смеси «Желчегонного сбора № 3»; 2 – спиртовой раствор ГСО цинарозида.

Таблица 3

Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в цветках пижмы обыкновенной и в модельной смеси желчегонного сбора № 3

Наименование объекта	f	\bar{X}	S	$P, \%$	$t(P, f)$	ΔX	$E, \%$
Цветки пижмы обыкновенной	10	1,98	0,0346	95	2,23	0,077	$\pm 3,90$
Модельная смесь «Желчегонного сбора № 3»	10	1,26	0,0664	95	2,23	0,047	$\pm 3,73$

5. Стандартизации и создание лекарственных препаратов на основе пижмы обыкновенной

С помощью проведенных аналитических, технологических и фармакологических исследований показана целесообразность разработки и внедрения новых отечественных лекарственных препаратов из цветков пижмы обыкновенной.

Разработан способ получения ЛП «Пижмы настойка» (экстрагент спирт этиловый 40%, соотношение «сырье-экстрагент» - 1:5) методом

модифицированной ремацерации. Изучение острой токсичности показало, что введение ЛП «Пижмы настойка» в дозе 15 г/кг на фоне 3% водной нагрузки не вызывало гибели лабораторных животных, что позволяет относить данное ЛС к IV классу токсичности (малотоксичные вещества) в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76.

Предложен состав и технология получения сиропа цветков пижмы. В рамках фармакологических исследований у ЛП «Пижмы настойка» и «Пижмы цветков сироп» выявлены диуретические свойства с тенденцией к проявлению калийсберегающего эффекта.

Разработаны и апробированы методики качественного и количественного анализа настойки и сиропа пижмы обыкновенной, в соответствии с которыми качественный анализ проводят методом тонкослойной хроматографии с использованием РСО тилианина, количественное определение суммы флавоноидов проводят методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на цинарозид, при аналитической длине волны 400 нм. Разработанные методики качественного и количественного определения суммы флавоноидов метрологически аттестованы, обоснованы числовые показатели.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выводы

1. В результате морфолого-анатомического исследования фрагментов порошка цветков пижмы обыкновенной определены новые диагностические признаки, позволяющие объективно идентифицировать сырье, а именно: характер поверхности цветоложа, оформленного упорядоченно расположенными местами прикрепления трубчатых цветков округлой формы; гинецей, имеющий неровную, ворсинчатую поверхность раздвоенного рыльца; крупное кольцо из нектарников желтого цвета, локализованное у основания столбика пестика; андроцей, представленный крупными, двухгнездными, сросшимися теками пыльниками, с заостренными верхушками, заполненными пыльцой желтого цвета или без нее; пыльцевые зерна округлой формы, равномерно шиповатые с тремя симметрично расположенными крупными бороздами с пыльцевыми мешками округлой формы.

2. На основании сравнительного морфолого-анатомического исследования обоснована методика определения подлинности порошка цветков пижмы обыкновенной и порошка цветков бессмертника песчаного, как представителей семейства Сложноцветные – компонентов желчегонных сборов № 2 и № 3.
3. В результате фитохимического изучения цветков пижмы обыкновенной с использованием химических, хроматографических и спектральных методов выделены и идентифицированы 7-О-β-D-глюкопиранозид акацетина (тилианин), 7-О-β-О-глюкопиранозид апигенина (космосин), акацетин (5,7-дигидрокси-4¹-метоксифлавонон) и апигенин (5,7,4¹-тригидроксифлавонон), хлорогеновая кислота.
4. Проведен ГЖХ-анализ равновесной паровой фазы из цветков пижмы обыкновенной, промышленных образцов сырья, настойки пижмы и препарата «Танацехол». Построены диаграммы-образы для идентификации исследуемых объектов и оценки их подлинности. В качестве маркеров цветков пижмы обыкновенной предложено использовать три компонента с наибольшим содержанием в паровой фазе ($A_{i,отн.} = 23,33\%, 15,1\%, 17,06\%$, с I_i^T на неполярной фазе: 474, 923, 1048).
5. Разработаны методики качественного анализа пижмы обыкновенной цветков с использованием спектофотометрии и метода тонкослойной хроматографии, основанного на определении доминирующего флавоноида тилианина, имеющего диагностическое значение.
6. Разработана методика количественного определения содержания суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид (аналитическая длина волны 400 нм) в цветках пижмы обыкновенной с использованием в качестве экстрагента спирта этилового 70% в режиме однократной экстракции.
7. Обоснована целесообразность использования методики количественного определения суммы флавоноидов в «Желчегонном сборе № 3» в пересчете на цинарозид при аналитической длине волны 400 нм.
8. Определены показатели качества сырья пижмы обыкновенной, для которого рекомендован новый числовой показатель «Содержание флавоноидов не менее 1,5%» в качестве нижнего предела содержания суммы

флавоноидов в пересчете на цинарозид, а также предложен новый показатель для «Желчегонного сбора № 3» «Содержание флавоноидов не менее 1%».

9. На основании химических и технологических данных разработаны состав и технология получения «Пижмы настойка» и «Пижмы цветков сироп», а также изучены показатели их качества.

10. В ходе фармакологических исследований разработанного лекарственного препарата «Пижмы цветков сироп» установлены диуретические свойства с тенденцией к проявлению калийсберегающего эффекта.

11. Разработан проект ФС «Пижмы цветки», который направлен в ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» с целью включения в Государственную Фармакопею РФ XII издания, а также проект ФСП «Пижмы настойка».

Практические рекомендации

Результаты диссертационной работы позволяют усовершенствовать методики анализа флавоноидсодержащего лекарственного растительного сырья и могут быть использованы в учебных процессах по курсам «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия», а также в центрах сертификации и контроля качества лекарственных средств и на фармацевтических предприятиях.

Перспективы дальнейшей разработки темы диссертационного исследования имеют важное научно-практическое значение для фармакогнозии и фармацевтической химии с целью дальнейшего изучения химического состава растений, содержащих флавоноиды, а также разработки отвечающих современным требованиям методов стандартизации лекарственного растительного сырья с применением новых методик анализа и приборной базы, изучения фармакологических эффектов лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Куркина, А.В. Методика определения суммы флавоноидов в цветках пижмы / А.В. Куркина, А.И. Хусаинова // **Фармация**. – 2010. – Т. 58, № 3. – С. 21-24.
2. Куркина, А.В. Актуальные аспекты стандартизации сырья и препаратов пижмы обыкновенной / А.В. Куркина, А.И. Хусаинова // **Медицинский альманах**. – 2010. - № 2 (11). – С. 322-326.
3. Куркина, А.В. Флавоноиды цветков *Tanacetum vulgare* / А.В. Куркина, А.И. Хусаинова, Е.Д. Даева, В.И. Каденцев // **Химия природных соединений**. – 2011. – № 2. – С. 256-257.
4. Куркина, А.В. Актуальные аспекты морфолого-анатомического анализа лекарственного растительного сырья пижмы обыкновенной (*Tanacetum vulgare* L.) / А.В. Куркина, В.М. Рыжов, Л.В. Тарасенко, А.И. Хусаинова // **Фундаментальные исследования**. – 2013. – № 8 (6). – С. 1420-1425.
5. Куркина, А.В. Оптимизация подходов к стандартизации сырья пижмы в рамках ресурсосберегающих технологий / А.В. Куркина, А.И. Хусаинова // **Известия Самарского научного центра Российской академии наук**. – 2013. – Т. 15, № 1(3). – С. 1984-1987.
6. Хусаинова, А.И. Проблемы стандартизации лекарственного препарата «Желчегонный сбор № 3» / А.И. Хусаинова // **Аспирантский вестник Поволжья**. – 2014. – № 1-2. – С. 260-263.
7. Хусаинова, А.И. Обоснование целесообразности создания и стандартизации сиропа цветков пижмы / А.И. Хусаинова, А.В. Куркина, В.А. Куркин // **Фундаментальные исследования**. – 2015. – № 2 (1). – С. 68-72.
8. Kurkina, A.V. Flavonoids from *Tanacetum vulgare* flowers / A.V. Kurkina, A.I. Khusainova, E.D. Daeva, V.I. Kadentsev // **Chemistry of Natural Compounds**. - 2011. - Vol. 47, No. 2. – P. 284.
9. Куркин, В.А. Актуальные аспекты использования государственных стандартных образцов в фармацевтическом анализе лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, О.Е. Правдивцева, А.В. Куркина и др. // XVII Российский Национальный конгресс «Человек и лекарство»: тезисы докладов. – Москва, 2010. – С. 658-659.
10. Куркин, В.А. Актуальные аспекты стандартизации эфиромасличного лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, О.Е. Правдивцева, А.В. Куркина и др. // XVII Российский Национальный конгресс «Человек и лекарство»: тезисы докладов. – Москва, 2010. – С. 659.
11. Куркина, А.В. Разработка новых подходов к стандартизации сырья и препаратов пижмы обыкновенной / А.В. Куркина, А.И. Хусаинова // 65-ая Межрегиональная конференция по фармации и фармакологии «Разработка, исследование и маркетинг

- новой фармацевтической продукции»: сборник научных трудов. – Пятигорск, 2010. – Вып. 65. – С. 333-341.
12. Куркин, В.А. Перспективы создания импортозамещающих нейротропных, иммуномодулирующих, антиоксидантных и гепатопротекторных фитопрепаратов / В.А. Куркин, А.В. Дубищев, Е.В. Авдеева, О.Л. Кулагин и др. // Материалы IV Международного медицинского форума Индустрия здоровья. II съезд натуротерапевтов России. Научно-практическая конференция Средства и методы традиционной китайской медицины. – Москва, 2011. – С. 23.
13. Хусаинова, А.И. Новые аспекты в микроскопическом анализе цветков пижмы обыкновенной / А.И. Хусаинова // Аспирантские чтения – 2011: Материалы Всероссийской конференции с международным участием «Молодые ученые медицине». – Самара, 2011. – С. 334-336.
14. Куркина, А.В. Анатомо-морфологическое исследование цветков пижмы обыкновенной / А.В. Куркина, А.И. Хусаинова // Материалы Всеукраинской научно-практической конференции студентов и молодых ученых. – Харьков, 2012. – Т. 1. – С. 124.
15. Куркина, А.В. Флавоноиды как критерий качества лекарственного растительного сырья / А.В. Куркина, К.А. Васякина, А.И. Хусаинова // Современные проблемы химической науки и образования: материалы Всероссийской конференции с международным участием, посвященной 75-летию со дня рождения В.В. Кормачева. – Чебоксары, 2012. – Т. 2. - С. 153-154.
16. Хусаинова, А.И. Анатомо-морфологическое исследование трубчатого цветка соцветия корзинка пижмы обыкновенной / А.И. Хусаинова // Аспирантские чтения – 2012: Материалы докладов Всероссийской конференции с международным участием «Молодые ученые медицине». – Самара, 2012. – С. 229-233.
17. Куркина, А.В. Совершенствование методов стандартизации цветков пижмы обыкновенной / А.В. Куркина, А.И. Хусаинова // Материалы IV Всероссийского научно-практического семинара. Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – Волгоград, 2012. – С. 81-82.
18. Куркина, А.В. Новые аспекты в области стандартизации сырья и препаратов пижмы обыкновенной / А.В. Куркина, А.И. Хусаинова // II Международная научная Интернет-конференция «Медицина в XXI веке: тенденции и перспективы». – Казань, 2013. – С. 19-22.
19. Хусаинова, А.И. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в сборе «Фитогепатол № 3» / А.И. Хусаинова // Материалы докладов Всероссийской конференции с международным участием «Молодые ученые медицине». – Самара, 2013. – С. 307-311.

20. Куркина, А.В. Изучение особенностей диагностики порошка цветков пижмы обыкновенной / А.В. Куркина, В.М. Рыжов, Л.В. Тарасенко, А.И. Хусаинова // Всероссийская научная Интернет-конференция с международным участием «Ботаника и природное многообразие растительного мира». – Казань, 2013. – С. 226 – 230.
21. Куркина, А.В. Совершенствование стандартизации цветков пижмы обыкновенной / А.В. Куркина, А.И. Хусаинова // Материалы XI Международной конференции «Медико-социальная экология личности: состояние и перспективы». – Минск, 2013. – С. 55-57.
22. Хусаинова, А.И. Изучение аспектов морфолого-анатомического анализа порошоканного сырья пижмы обыкновенной / А.И. Хусаинова // Сборник материалов IV Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». – Санкт-Петербург, 2014. – С. 585-588.
23. Хусаинова, А.И. Сравнение анатомо-морфологических признаков ведущих компонентов желчегонного сбора № 2 и желчегонного сбора № 3 / А.И. Хусаинова // Материалы докладов Всероссийской конференции с международным участием «Молодые ученые 21 века – от современных технологий к инновациям». – Самара, 2014. – С. 305-306.
24. Хусаинова, А.И. Сравнительная характеристика диагностических признаков цветков пижмы обыкновенной и бессмертника песчаного / А.И. Хусаинова, А.В. Куркина, В.М. Рыжов, Л.В. Тарасенко // Интер-медикал. – 2014. – № 5. – С. 81-86.
25. Хусаинова, А.И. Фармакогностическое исследование сырья и препаратов пижмы обыкновенной / А.И. Хусаинова, А.В. Куркина // Сборник трудов второй научно-практической конференции «Молодые ученые и фармация XXI века». – Москва, 2014. – С. 118-122.