

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САМАРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ» МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

МУБИНОВ АРТУР РУСТЕМОВИЧ

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЧЕРНУШКИ
ПОСЕВНОЙ (*NIGELLA SATIVA* L.)**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
доктор фармацевтических наук,
профессор
Авдеева Елена Владимировна

Самара – 2023

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ЧЕРНУШКА ПОСЕВНАЯ (<i>NIGELLA SATIVA</i> L.) КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	16
1.1. Историческая справка по роду Чернушка (<i>Nigella</i> L.).....	16
1.2. Ботаническое описание основных представителей рода Чернушка (<i>Nigella</i> L.), произрастающих на территории России.....	18
1.2.1. Чернушка посевная	18
1.2.2. Чернушка полевая	20
1.2.3. Чернушка дамасская	21
1.2.4. Другие виды чернушки.....	22
1.3. Чернушка посевная как перспективный источник биологически активных соединений	25
1.3.1. Химический состав чернушки посевной.....	25
1.3.2. Стандартизация чернушки посевной.....	33
1.3.3. Фармакологические свойства чернушки посевной и применение в медицинской практике	36
1.3.4. Селекция, культивирование и агротехника чернушки посевной	40
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ I.....	43
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	44
2.1. Объекты исследования	44
2.2. Методы исследования.....	47
2.2.1. Методы микроскопического анализа.....	48
2.2.2. Методы химического анализа	48
2.2.3. Хроматографические методы анализа.....	49
2.2.4. Спектральные методы анализа	51
2.2.5. Технологические методы	52
2.2.6. Фармакологические методы исследования.....	52
2.2.7. Статистическая обработка результатов исследования	55
ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАВЫ ЧЕРНУШКИ ПОСЕВНОЙ (<i>NIGELLA SATIVA</i> L.).....	58

3.1. Морфолого-анатомическое изучение и выявление диагностически значимых признаков травы чернушки посевной.....	59
3.1.2. Изучение морфологических и анатомических признаков вегетативной части травы чернушки посевной (листья и стебель).....	59
3.1.2. Изучение морфологических и анатомических признаков генеративной части травы чернушки посевной (цветки)	66
3.2. Люминесцентное микроскопическое детектирование диагностически значимых биологически активных соединений в траве чернушки посевной	73
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	76
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ТРАВЫ ЧЕРНУШКИ ПОСЕВНОЙ (<i>NIGELLA SATIVA</i> L.).....	77
4.1. Выделение из травы чернушки посевной индивидуальных веществ....	77
4.2. Изучение выделенных из травы чернушки посевной индивидуальных веществ.....	79
4.3. Установление химической структуры выделенных веществ.....	81
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	90
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ТРАВЫ И МАСЛА ЧЕРНУШКИ ПОСЕВНОЙ (<i>NIGELLA SATIVA</i> L.).....	91
5.1. Качественный анализ травы чернушки посевной химическими методами	91
5.2. Качественный анализ травы чернушки посевной методами ТСХ и УФ-спектрофотометрии.....	93
5.3. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве чернушки посевной	96
5.4. Анализ динамики накопления флавоноидов в траве чернушки посевной.....	104
5.5. Определение общих показателей качества перспективного лекарственного растительного сырья «Чернушки посевной трава»	105
5.6. Сравнительный анализ жирнокислотного состава масел чернушки посевной различных регионов произрастания.....	107
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5	112
ГЛАВА 6. ОБОСНОВАНИЕ ПЕРСПЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ТРАВЫ И МАСЛА ЧЕРНУШКИ ПОСЕВНОЙ (<i>NIGELLA SATIVA</i> L.)	114

6.1. Изучение антимикробной и противогрибковой активности водно-спиртовых извлечений и настойки травы чернушки посевной	115
6.2. Изучение безопасности настойки травы чернушки посевной	120
6.3. Изучение антиоксидантной активности жирного масла чернушки посевной	120
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6	127
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	129
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	132
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	156
Приложение 1. Люминесцентная микроскопия травы чернушки посевной	157
Приложение 2. Результаты определения биоаккумуляции суммы флавоноидов в траве чернушки посевной	162
Приложение 3. Результаты ГХ-МС анализа жирных масел чернушки посевной	163
Приложение 4. Хроматограммы жирных масел чернушки посевной	165
Приложение 5. Акты о внедрении результатов диссертационного исследования.....	167
Приложение 6. Патент на изобретение «Способ количественного определения суммы флавоноидов в траве чернушки посевной»	175
Приложение 7. Проект фармакопейной статьи «Чернушки посевной трава»	176

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Создание отечественных эффективных и безопасных лекарственных средств и лекарственных субстанций является приоритетным направлением для российской фармацевтической науки и индустриального сектора экономики, что отражено в Приказе Минздрава России от 13.02.2013 г. № 66 (ред. от 13.07.2021) «Об утверждении Стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года и плана ее реализации» и постановлении Правительства Российской Федерации от 29.12.2021 № 2544 "О внесении изменений в государственную программу РФ "Развитие фармацевтической и медицинской промышленности", а также в ряде других нормативных актов. Приоритеты государственной политики сосредоточены на импортонезависимости, развитии производственных мощностей, разработке и обеспечении качества лекарственных препаратов и медицинских изделий.

Данные целевые установки в области фармакогнозии сегментируются на следующие актуальные задачи: поиск перспективных природных источников лекарственных средств (ЛС), изучение химического состава новых видов растительного сырья или расширение спектра представлений о потенциале официальных видов, изучение параметров качества и решение вопросов стандартизации лекарственного растительного сырья (ЛРС) и лекарственных препаратов (ЛП), разработка способов получения и обоснование использования в медицинской практике. Перспективность направления обусловлена несколькими факторами. Около 4000 наименований ЛП на фармацевтическом рынке Российской Федерации - растительного происхождения (Государственный реестр лекарственных средств; Самылина И.А. и др., 2016). Их ассортимент увеличивается ввиду значимой роли фитопрепаратов в терапии хронических заболеваний - возможности их длительного приёма, мягкости и комплексности действия (Куркин В.А., 2020; Зилфикаров И.Н., 2021).

Настоящая работа посвящена одному из перспективных растительных объектов семейства Лютиковые (*Ranunculaceae*), рода Чернушка (*Nigella*) – чернушке посевной (*Nigella sativa* L.). Потенциал использования данного растения в медицине очевиден, однако доказательно в полной мере не оценен. Чернушка посевная не входит в Государственную фармакопею Российской Федерации (ГФ РФ) и в фармакопеи других стран. Она в основном распространена на Ближнем Востоке, Средиземноморье и Южной Европе. В РФ данный и другой известный вид – чернушка дамасская (*Nigella damascena* L.), - часто встречаются в южных областях Европейской части России, на Кавказе и в Крыму. Активно селекцией чернушки занимались в Краснодарском и Ставропольском краях, также в Республике Дагестан (Хабибов А.Д. и др., 2008; Маширова С.Ю., 2013; Рудь Н.К., 2017), и отечественная сырьевая база может быть расширена. В этой связи проведение фармакогностического изучения растительного сырья чернушки посевной и перспектив его использования в качестве официального вида ЛРС для получения ЛП и ЛС является актуальным направлением исследований.

Степень разработанности темы. Наиболее подробно представлены морфологические сведения, данные о фармакологической активности и фитохимическом составе семян чернушки посевной и чернушки дамасской. В частности, морфолого-анатомический анализ семян чернушки посевной и чернушки дамасской микроскопических отличий не выявил (Орловская Т.В. и др., 2012; Маширова С.Ю., 2013). Основными группами биологически активных соединений (БАС), обеспечивающих фармакологические свойства жирного масла семян (гепатопротекторная, антиоксидантная, противомикробная и другие виды активности) являются эссенциальные жирные кислоты, эфирное масло (тимохинон и дитимохинон), стероиды (стигмастерин, β -ситостерин), фермент липаза, алкалоиды (нигеллин, нигеллицин), фенольные соединения и органические кислоты (Рудь Н.К. и др., 2013, 2017; Сампиев А.М. и др., 2014; Давитанян Н.А. и др., 2015; Aftab A. et al., 2018; Harzallah, H.J. et al., 2011, 2012; Pop R.M., 2018; Kanter M. et al., 2005).

Ряд работ отечественных и зарубежных ученых свидетельствует о широких возможностях использования масла чернушки в фармацевтической и парафармацевтической практике (Шиков А.Н. и др., 2004; Рудь Н.К. и др., 2015, Pop R.M., 2018; Islam M.T. et al., 2017; Hamdy N., 2009). Так, отечественными исследователями был разработан ЛП – сверхкритический углекислотный экстракт из семян чернушки посевной в желатиновых капсулах с высоким содержанием тимохинона (в отличие от коммерческих образцов масел чернушки) и ценных гидрофильных БАС (Рудь Н.К. и др., 2015). В Индонезии активно используется гель на основе масла чернушки посевной против диабетических язв (Sary Y.A. et al., 2018); есть и другие примеры медицинского применения (Chaieb K. et al., 2011; Aftab A. et al. 2018; Salehi B. et al., 2021).

Помимо семян чернушки посевной представляют интерес и другие морфологические органы растения, в частности, трава. В зарубежной и отечественной научной литературе информации по морфолого-анатомическому, фитохимическому и фармакологическому исследованию травы чернушки посевной гораздо меньше, чем по семенам и жирному маслу, несмотря на превалирующую биомассу вегетативной части по сравнению с семенами растения. В основном определялся качественный состав экстрактов травы чернушки посевной, общее количество фенолов (Bourgou S. et al., 2008; Aftab A. et al., 2018, 2020). Для травы также был установлен спектр фармакологической активности – антидиабетический, антиоксидантный и антимуtagenный (Bourgou S. et al., 2008; Шарофова М.У. и др., 2018).

Вышеизложенные факты свидетельствуют об актуальности исследования химического состава, решения вопросов стандартизации нового вида ЛРС чернушки посевной, изучения перспектив разработки ЛС.

Цель и задачи исследования. Цель настоящей диссертационной работы – научное обоснование использования в фармацевтической практике нового вида лекарственного растительного сырья «Чернушки посевной трава»

и жирного масла чернушки посевной в качестве потенциальных источников лекарственных растительных препаратов.

Решены следующие задачи для достижения поставленной цели:

1. Проведение морфолого-анатомического исследования травы чернушки посевной (*Nigella sativa* L.).
2. Изучение химического состава травы чернушки посевной.
3. Проведение сравнительного анализа жирнокислотного состава масел чернушки посевной различных регионов произрастания.
4. Разработка методик качественного анализа травы чернушки посевной.
5. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве чернушки посевной.
6. Изучение антимикробной и противогрибковой активности, а также острой токсичности настойки из травы чернушки посевной.
7. Сравнительное изучение антиоксидантной активности масел чернушки посевной различных регионов произрастания.
8. Установление значений показателей качества травы чернушки посевной для проекта фармакопейной статьи (ФС) на новый вид ЛРС «Чернушки посевная трава».

Научная новизна. В ходе диссертационного исследования впервые проведено подробное морфолого-анатомическое исследование травы чернушки посевной (*Nigella sativa* L.), в том числе с использованием метода люминесцентной микроскопии. Для травы чернушки посевной в качестве диагностически значимых признаков отмечены: особое двухгубое строение опушенного нектарника в цветке и характерное опушение вегетативных органов каплевидными двухклеточными волосками.

Впервые из травы чернушки посевной выделены и идентифицированы нигелфлавонозид G (3-O-β-D-[α-L-О-рамнопиранозил-(1→6)]-глюкопиранозид-[(2→1)-О-β-D-глюкопиранозил-(2→1)-О-β-D-глюкопиранозил]-3,5,6,7,4'-пентагидрокси-3'-метоксифлавона), который имеет диагностическое значение для сырья, и даукостерин (3-O-β-D-глюкопиранозид β-ситостерина).

Впервые в РФ из травы чернушки посевной, выращенной в Ульяновской и Самарской обл., также выделены и идентифицированы вещества - никотифлорин (3-О-β-D-глюкопиранозид кемпферола), рутин и β-ситостерин, химическая структура которых установлена с применением методов УФ-, ¹H-ЯМР- и ¹³C-ЯМР-спектроскопии, а также масс-спектрометрии.

Впервые разработаны методики качественного и количественного анализа БАС в траве чернушки посевной с использованием методов тонкослойной хроматографии (ТСХ) и спектрофотометрии.

Впервые проведено исследование антимикробной и противогрибковой активности водно-спиртовых извлечений и настойки травы чернушки посевной в отношении *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (клинический штамм), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). Доказана выраженная активность для всех извлечений, в особенности для настойки, в т.ч. в отношении *Pseudomonas aeruginosa*.

Проведено сравнительное изучение жирнокислотного профиля масел чернушки посевной из различных географических зон произрастания; установлено доминирование эссенциальных жирных кислот и наличие эфиромасличной фракции методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием (ГХ-МС). Результаты сравнительного анализа антиоксидантной активности жирных масел доказали их способность подавлять генерацию активных форм кислорода (АФК) и перекисное окисление липидов (ПОЛ) в модельных системах.

Проведено исследование острой токсичности настойки травы чернушки посевной, которое подтвердило её безопасность для дальнейшего изучения с целью использования в медицинской практике.

Научная новизна проведенного диссертационного исследования доказана патентом Российской Федерации на изобретение № 2786440 «Способ количественного определения суммы флавоноидов в траве чернушки посевной» (приложение № 6).

Теоретическая и практическая значимость. Значимость диссертационного исследования заключается в расширении спектра представлений о чернушке посевной как перспективном сырьевом источнике отечественных лекарственных препаратов. С позиции современных подходов к стандартизации растительного сырья разработаны методики качественного и количественного определения флавоноидов в траве чернушки посевной с использованием методов ТСХ и УФ-спектрофотометрии.

Установлены числовые показатели качества травы чернушки посевной, включая содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин - не менее 1,0 %, а также разработан раздел «Микроскопия», что было введено в проект ФС на новый вид ЛРС «Чернушки посевной трава». Изучен компонентный состав жирного масла чернушки посевной, установлены его параметры качества. Обосновано использование масла в фармацевтической и парафармацевтической практике как антиоксидантного средства.

Выявлено наличие антимикробной активности водно-спиртовых извлечений и настойки травы чернушки посевной в отношении *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (клинический штамм), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213). В ходе исследования выбран и обоснован оптимальный экстрагент (70% спирт этиловый) для получения лабораторного образца экстракционного препарата «Чернушки травы настойка». Для него был установлен III класс токсичности (вещества умеренно опасные).

Внедрение результатов исследования. Результаты данного диссертационного исследования внедрены в научный и учебный процессы на нескольких кафедрах Института фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. Разработанные методики анализа растительного сырья и продуктов из чернушки посевной апробированы и используются в рабочих процессах в ЗАО «Самаралектравы», ООО «Лекарь» и ООО «Самарская фармацевтическая фабрика», а также в ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств

Самарской области». Соответствующие акты внедрения приведены в приложении № 5 диссертации.

Связь темы исследований с планом научно-исследовательских работ. Диссертационная работа проведена в соответствии с тематическим планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России: от 14.05.2019 г. № Гос. регистрации АААА-А19-119051490148-7 комплексная НИОКР - «Химико-фармацевтические, биотехнологические, фармакологические и организационно-экономические исследования по разработке, анализу и применению фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов».

Методология и методы исследования. Базирующаяся на системном анализе и обобщении литературных данных отечественных и зарубежных источников методология диссертационного исследования включала оценку состояния степени изученности объекта исследования, постановку цели и задач, осуществление экспериментальной работы по фармакогностическому исследованию чернушки посевной (*Nigella sativa* L.).

Объектами исследований служила трава чернушки посевной, выращенная в Самарской и Ульяновской областях. Сырье было заготовлено в Ботаническом саду Самарского университета и в Чердаклинском районе Ульяновской области в разные вегетационные периоды. Также для изучения качественного состава и фармакологической активности масла чернушки посевной использовались образцы масел из различных географических зон (Египет, Пакистан, Саудовская Аравия, Россия).

Морфолого-анатомическое исследование травы чернушки посевной проводили с применением методов микроскопии (в проходящем свете и люминесцентной). Исследование химического состава осуществляли методами тонкослойной хроматографии, УФ-, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, использовались пробирочные и гистохимические реакции.

Анализ образцов масел чернушки посевной проводился методом ГХ-МС после перевода жирных кислот в метиловые эфиры. Антиоксидантную

активность определяли методом регистрации хемилюминесценции в модельных системах выработки АФК и ПОЛ.

В соответствии с Государственной фармакопеей РФ XIV издания и с применением специализированного программного обеспечения (STATISTICA 8.0 и ChemMetr 1.0.) проводили статистический анализ результатов экспериментов.

Положения, выдвигаемые на защиту:

1. Результаты морфолого-анатомического изучения травы чернушки посевной.
2. Данные по химическому составу травы чернушки посевной, способам препаративного выделения индивидуальных веществ.
3. Результаты сравнительного изучения жирнокислотного состава масел чернушки посевной различных регионов произрастания.
4. Методики качественного анализа травы чернушки посевной с применением методов ТСХ-анализа и спектрофотометрии.
5. Методика количественного определения содержания суммы флавоноидов в траве чернушки посевной методом дифференциальной спектрофотометрии.
6. Результаты исследования антимикробной и противогрибковой активности, а также определения острой токсичности настойки из травы чернушки посевной.
7. Результаты сравнительного изучения антиоксидантной активности масел чернушки посевной различных регионов произрастания.
8. Обоснование целесообразности комплексной переработки растения и проект ФС на новый вид ЛРС «Чернушки посевной трава».

Степень достоверности. Достоверность диссертационной работы подтверждена результатами, достигнутыми в ходе проведения экспериментов с применением различных современных и классических методов - микроскопии (световой и люминесцентной), хроматографии (тонкослойной, колоночной и газовой), спектрального анализа (УФ-, ЯМР-спектроскопии и

масс-спектрометрии), а также других методов анализа (химических, фармакологических и микробиологических). Результаты экспериментов были подвергнуты статистической обработке.

Личный вклад автора. Результаты данных исследований, представленных в диссертационной работе, получены автором лично. Проведен анатомо-гистологический анализ травы *Nigella sativa* L., установлены характерные диагностические признаки для изучаемого вида сырья. При непосредственном участии автора проведены все фитохимические исследования и изучена фармакологическая активность водно-спиртовых извлечений и настойки из травы, жирных масел чернушки посевной. Разработана технология получения в лабораторных условиях настойки из травы чернушки посевной. Автор является главным разработчиком всей нормативной документации на ЛРС «Чернушки посевной трава» и другой научной продукции.

Соответствие диссертационной работы паспорту научной специальности. Представленные в тексте диссертационной работы основные положения полностью соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2. «Фармацевтическая химия, фармакогнозия» (фармацевтические науки) по пунктам 2, 3, 5 и 6.

Публикации. Основные результаты диссертационного исследования представлены в 14 печатных публикациях, в том числе 5 статей – в журналах, включенных ВАК в перечень рецензируемых научных изданий, из них 3 статьи в журналах, включенных в МБД; 1 статья в журнале, индексируемом в международной базе Scopus. Получен патент РФ на изобретение (приложение № 6).

Апробация работы. Основные материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на научных конференциях различных уровней: на II Международной научной конференции «Роль метаболомики в совершенствовании биотехнологических средств производства» (г. Москва, 2019 г.); Международной научной конференции «Современные тенденции

развития технологий здоровьесбережения» (Москва, 2020 г.); Всероссийской научно-практической онлайн-конференции с международным участием «Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы» (Самара, 2021); Международной научной конференции «90 лет – от растения до лекарственного препарата» (г. Москва, 2021 г.); Международной научно-практической конференции «Фармацевтическая наука XXI века: актуальные проблемы и перспективы их решений» (Уфа, 2022 г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Аспирантские чтения» (г. Самара, 2020; 2021, 2022).

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 187 страницах машинописного текста, проиллюстрирована 47 рисунками и 23 таблицами. Содержание работы представлено введением, литературным обзором, главой об объектах и методах исследования, 4 главами экспериментальных исследований, а также выводами и заключением. Список литературы состоит из 192 источников, среди которых 99 на иностранном языке. В конце работы после списка литературы представлены 7 приложений.

Глава 1 - обзор научной литературы в области фармакогностического исследования чернушки посевной и других представителей рода *Nigella*. Рассмотрены вопросы, касающиеся таксономической и ботанической характеристики, ареалов распространения, особенностей химического состава, фармакологических свойств и применения в традиционной и современной медицине, а также культивирования и агротехники чернушки посевной. Также обсуждены вопросы современного состояния исследований в области стандартизации сырья чернушки посевной и возможностей применения данного вида в медицинских целях.

В **главе 2** содержатся подробные сведения об объектах и о методах исследования.

В **главе 3** описаны результаты морфолого-анатомического изучения нового вида ЛРС травы чернушки посевной, в том числе с помощью метода люминесцентной микроскопии.

В главе 4 отражены результаты фитохимического исследования травы чернушки посевной, а именно выделения и идентификации индивидуальных соединений, а также обоснование подходов к определению подлинности сырья по ведущей группе БАС – флавоноидам.

Глава 5 посвящена разработке методик качественного и количественного анализа травы чернушки посевной, а также сравнительному анализу жирнокислотного состава масел чернушки посевной различных регионов произрастания с установлением соответствующих критериев доброкачественности.

Глава 6 содержит результаты исследования антимикробной и противогрибковой активности, а также безопасности лабораторных образцов настойки травы чернушки посевной; обсуждаются данные сравнительного изучения антиоксидантных свойств масел семян растения различного происхождения.

Диссертация завершается заключением, выводами, списком литературы и приложениями.

ГЛАВА 1. ЧЕРНУШКА ПОСЕВНАЯ (*NIGELLA SATIVA* L.) КАК ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК ЛЕКАРСТВЕННЫХ РАСТИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Представители рода Чернушка (*Nigella* L.), известные также под названием «чёрный тмин», используются с глубокой древности как лекарственные и пищевые растения, а также - в косметических целях. Семена наиболее известного вида - чернушки посевной (ч. посевной), использовали для профилактики и лечения различных патологий, таких как заболеваний сердечно-сосудистой системы и желудочно-кишечного тракта, также применяли при системных аллергических реакциях и кожных проблемах, и во многих других случаях. В настоящее время ч. посевная не является фармакопейным растением, несмотря на многолетний интерес исследователей к данному виду и широкие возможности её культивирования.

1.1. Историческая справка по роду Чернушка (*Nigella* L.)

Родовое наименование *Nigella* L. (лат. *nigella* — от *nigellus*, *a um* — черноватый, уменьш. от *niger*, *a, um* — черный) характеризует плоды, представляющие собой листовки с черными семенами [3, 32]. По классификации А.Л. Тахтаджяна, род Чернушка (*Nigella* L.) относится к отделу *Magnoliophyta*, классу *Magnoliopsida*, подклассу *Ranunculidae* [80]. Род Чернушка (*Nigella* L.) состоит из 24 видов, произрастающих в Средиземноморье, Южной и Юго-Восточной Европе, на Кавказе, в Малой и Средней Азии, Северной Африке; в странах СНГ встречается 11 видов [22, 60].

Чернушка как одна из самых известных и популярных восточных, арабских пряностей и растительных средств имеет много названий, таких как упомянутый «чёрный тмин», «калинджи», «римский кориандр», «нигелла», «седана» [62]. Самое часто встречающееся название «чёрный тмин» растению, предположительно, дали турецкие и португальские купцы. В восточных, чаще всего в мусульманских, странах она известна именно как чёрный тмин [19, 119, 163]. В англоязычных странах можно встретить

название «*love-in-a-mist*», что буквально переводится как «любовь в тумане» [86]. В научной литературе в основном используют словосочетания *Black cumin* или *Nigella sativa* L. (*Seed Oil, Species, Plant* и другие) [169, 175].

История использования чернушки для получения масла в народной медицине стран Ближнего Востока, Азии, Африки насчитывает более 2000 лет. Масло чернушки было обнаружено в гробнице египетского фараона Тутанхамона. В исламе о чёрном тмине сказано в Коране, так как его семена считаются как одно из величайших из всех возможных средств лечения. Нигелла называется растением Пророка Мухаммеда в мусульманской религии, который её называл «средством от всех болезней кроме смерти». Также чернушка была известна в средневековой Европе – входила в перечень лекарственных трав монастырских садов. По приказу короля Франции Людовика IX монахи и крестьяне в Европе должны были в монастырских садах и на своих участках выращивать нигеллу как значимое лекарственное и пряное растение [1, 136].

О чернушке сказано в медицинских трактатах Гиппократ и Авиценны, а также у других известных и уважаемых ученых древности. Древние лекари считали нигеллу «травой с небес». Растение было известно среди всех древних лекарственных принятых систем, таких как унани тибб., сидха, аравийская, аюверда, китайская и многих других. Кроме того, о пользе использования данного растения в кухне и медицине также писал знаменитый ученый и врач Авиценна в своём трактате «Канон врачебной науки» [62, 97].

В исторической ретроспективе хорошо известны и используются как пищевые и лекарственные растения, главным образом, данные виды чернушки: *Nigella damascena* L. (ч. дамаская) – растет в Северной Африке, Юго-Восточной Европе, в Закавказье и Западной Азии; *N. indica* Roxb. (ч. индийская) – растет в Индии, Пакистане, Афганистане; *N. grandulifera* (ч. железистая) – в основном встречается в Туркменистане и в западных районах Китая; *N. sativa* L. (ч. посевная) – чаще распространена в странах Востока,

Средней Азии и Южной Европы, встречается в Европейской части РФ, на Кавказе [2, 82, 88].

1.2. Ботаническое описание основных представителей рода Чернушка (*Nigella* L.), произрастающих на территории России

1.2.1. Чернушка посевная

Чернушка посевная – *Nigella sativa* L. (лат. *sativus*, *a*, *um* – посевной), однолетнее травянистое растение. Стебель высокий (30–50 см), прямостоячий, трехгранный и морщинисто-бугорчатый, простой у основания, разветвленный в верхней части. Растение имеет дважды перисто-рассеченные листья. Чашечка венчикообразная, состоящая из 5 синих 1-1,5 см длиной продолговатых чашелистиков. Чашелистики на вершине притупленные, но суженные при основании. На короткой ножке находятся двугубые лепестки-нектарники, которые слабо опушены. Верхняя губа нектарников продолговатая, выше она сужена в линейное окончание, которое несколько короче второй губы, которая разделена на две доли сверху, которые также к основанию сужены. Плодолистики сверху тупые или могут быть слегка заостренные; имеются зернисто-бугристые листовки, они сросшиеся и вздутые, по спинке листовки округлые, с почти равным закрученным носиком [3, 58, 82].

Цветки одиночные, довольно крупные, расположены на верхушках ветвей, выделяются голубоватым или зеленоватым рисунком на концах лепестков. Цветет с июля по сентябрь [58, 93].

Плод – листовка с морщинистыми черными семенами. Семена имеют сильный пряно-перечный запах. Плоды зреют в августе-сентябре. Плодов-листовок - обычно 5-10 [48, 58]. Листовки сросшиеся и вздутые, с закругленным и длинным носиком (рис. 1).



Рисунок 1 – Внешний вид чернушки посевной (*Nigella arvensis* L.)

Стоит отметить известные, но немногочисленные микроскопические признаки, описанные исследователями для ч. посевной: прямоугольный стебель с хорошо развитой опорной тканью в углах, представленной колленхимой; проводящей системой, представленной коллатеральными пучками; неправильная форма клеток эпидермиса с анокитными устьицами; наличие опушения - нежелезистый тип трихом; также описаны некоторые особенности строения корня [144, 172].

В данный момент ч. посевная культивируется в Европе, Болгарии, Южной и Восточной Азии, на Средиземноморье и Среднем Востоке. Нигелла активно используется в Пакистане, Саудовской Аравии, Иране, Индии, Афганистане и Тунисе. Распространяется она также в Крыму и Закавказье, Литве, в Молдавии и на Украине. Кроме того, произрастает в южных регионах европейской части России и на Кавказе. В РФ её чаще культивируют как декоративное растение. Чернушка посевная является рудеральным видом [5, 17, 34, 65].

Важнейшей особенностью ч. посевной является то, что плоды при созревании растрескиваются только при существенном механическом

воздействию, что позволяет значительно сократить потери семян как основного урожая. Данный факт выгодно выделяет ч. посевную от других родственных видов.

1.2.2. Чернушка полевая

Чернушка полевая – *Nigella arvensis* L. (*arvensis*, е – пашенный, полевой). Сизо-зеленое травянистое растение с ребристым, по ребрам мелкобугористым, прямым, реже ветвистым стеблем высотой 20-50 см. Её листья перисто-рассеченные на немногочисленные узколинейные доли и длиной 2-4 см, могут иметь завернутые и мелко шершавые края [63, 82].

Цветки имеют чашелистики длиной около 2,0 см, с резко выступающими обратнойцевидными жилками. Также имеются мелкие двугубые лепестки-нектарники. Губа верхняя при основании округлённая и расширенная, но далее вытянута в остроконечие. Губа нижняя опушена, имеет яйцевидную форму, нередко имеет зеленый цвет и синие поперечные полосы, также есть рассечение на две по типу мозолистоутолщенных сверху дольки.

Плоды при основании срастаются до половины, они продолговатые и сильношершавые листовки. Имеется длинный бугристый носик при переходе с ребер, который может быть почти равным листовкам. Плоды зреют в основном в августе [48, 63, 82] (рис. 2).



Рисунок 2 – Внешний вид чернушки полевой (*Nigella arvensis* L.) [36]

Произрастает на сухих степных и каменистых склонах, в посевах и мусорных местах. Встречается в Европейской части России, часто на территории Кавказа и Закавказье, в Средней Азии [42, 64, 82].

1.2.3. Чернушка дамасская

Чернушка дамасская – *Nigella damascena* L. (*damascenus, a, um* – геогр. дамасский). Является травянистым однолетним растением с прямым стеблем и высотой около 60 см, иногда имеющим слегка фиолетовый оттенок. Она имеет жесткие, очередные дважды-трижды перисто-рассеченные листья с килем. Длиной листья могут быть до 10 см и шириной до 5 см, а верхние листья сгруппированы под цветком и образуют покрывало над ним [3, 13, 63].

Цветки у ч. дамасской крупные, одиночные с диаметром до 4 см. Они расположены, главным образом, на концах стеблей. Чашелистики цветка синие или голубые (могут быть и белого оттенка) в количестве пяти. Имеется 5-8 лепестков-нектарников, которые короче, чем чашелистики. В цветке много тычинок, а пестик имеет верхнюю завязь. Цветет в июне – июле [13, 21, 32].

Плодами являются 5 вздутых листовок, которые срастаются почти до вершины и образуют шаровидную коробочку, заполненную трехгранными семенами [13, 63]; созревают они в августе – сентябре (рис. 3).

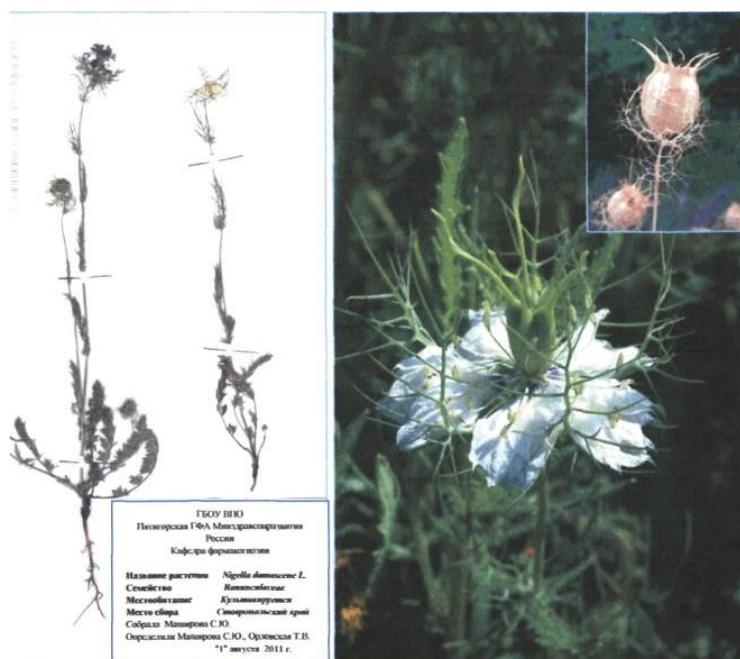


Рисунок 3 – Внешний вид чернушки дамасской (*Nigella damascena* L.) [45]

Средиземноморье является родиной чернушки дамасской. В настоящее время культивируется в Европе, Индии и Малой Азии. В РФ растет на юге европейской части России, также в СНГ и на Кавказе. Также является рудеральным растением, малотребовательна к условиям произрастания [13, 78].

1.2.4. Другие виды чернушки

Чернушка восточная (*Nigella orientalis* L.) - однолетнее травянистое растение высотой около 40 см с небольшими желтыми цветками, имеет резко граненый, голый стебель. Листья ч. восточной дважды перисто-рассеченные, также рассечены на узколинейные дольки, которые по краям вниз завернуты и усажены вниз короткими щетинками.

Чашелистики цветка продолговатые и жёлтые, длиной до 1,5 см. В основании имеется сужение в короткую ножку, однако на верхушке они переходят в остроконечие, а внизу по жилкам также снабжены щетинками. В цветке лепестки-нектарники сами вдвое короче чашелистиков, есть короткая, но широкая ножка. Губа верхняя короткая и на вершине заостренная. Другая губа яйцевидно-продолговатая и длиннее в 2 раза (рис. 4).



Рисунок 4 – Внешний вид чернушки восточной (*Nigella orientalis* L.) [79]

Тычинки растения заостренные. Листовки по форме сплюснутые, срастаются почти до половины и 2-3 см длиной, наверху в количестве около 5-12 сильно расходятся. По окраске листовки зеленовато-жёлтые и блестящие, по спине есть три жилки, переходящие в прямой носик. Семена яйцевидные. Произрастает на степных склонах, в посевах. Можно встретить на Кавказе, также в Малой Азии [82].

Чернушка пашенная – *Nigella segetalis* M. Bieb. (лат. *segetalis* – пашенный, нивяный). Это зеленое однолетнее травянистое растение. Имеет прямой простой или сильно ветвистый бороздчатый, голый стебель, Листья дважды перисто-рассеченные на немногочисленные линейные или линейно-щетиновые дольки.

Чашелистики цветка ч. пашеной голые, обратнойцевидные и небольшие - длиной до 1,2 см. У цветка лепестки-нектарники находятся на ножке, имеются редкие волоски. По строению губ: верхняя губа продолговато-ланцетная, при основании широкая; она вытянута сверху остроконечие, которое более короткое, чем вторая губа. Нижняя губа посредине глубоко рассечена на несколько ланцетных долей, оттянутых в своеобразные мозолистые утолщения (рис. 5).



Рисунок 5 – Внешний вид чернушки пашенной (*Nigella segetalis* M. Bieb.) [61]

Плоды – сильно зернисто-бугорчатые листовки, сросшиеся на две трети длины. Наверху они расходятся, обычно узкоцилиндрические, но округлые по спинке основания. Имеется три выдающиеся жилки, переходящие на носик, который короче листовки в два раза.

Распространяется по посевам, сорным местам, степным склонам. Встречается в Крыму, на Кавказе [64, 82].

Чернушка высокая – *Nigella elata* Boiss., синоним *N. taurica* Steven (лат. *elata* – высокий; *taurica* – геогр. Таврический Херсонес, ныне Крым). Близкородственный таксон с *N. damascena* L., поэтому имеют весьма схожие признаки. Однако есть отличительные черты: у цветков лопасти нижней губы лепестков-нектарников оканчиваются линейными коленчато-изогнутыми придатками, коробочки практически невздутые, твёрдые. Кроме того, растение имеет более высокий и ветвистый стебель, чем *N. damascena* L. В целом, *N. elata* Boiss. характеризуется более ксероморфными чертами [17, 72] (рис. 6).



Рисунок 6 – Внешний вид чернушки высокой (*Nigella elata* Boiss.) [39]

Ч. высокая развивается медленнее: цветение начинается в конце июня и продолжается до середины августа. Растет на сухих каменистых склонах. Отмечена в Крыму (Южный берег Крыма, в окрестностях Симферополя) [72].

1.3. Чернушка посевная как перспективный источник биологически активных соединений

1.3.1. Химический состав чернушки посевной

В последние годы интерес отечественных и зарубежных ученых к изучению химического состава представителей рода *Чернушки* и, в частности, ч. посевной как широко распространенной культуре с потенциалом возделывания в промышленных объемах (в том числе в России), непреклонно растёт [45, 62, 67, 175]. В основном исследователи подвергали изучению семена чернушки, так как они накапливают ценное, широко известное *масло чёрного тмина (Black seed oil)*, богатое полиненасыщенными кислотами и другими разнообразными группами липофильных биологически активных соединений (БАС); его содержание достигает до 40-50% от массы семян [53, 65, 67]. Жирное масло в данный момент является наиболее ценным продуктом нигеллы и представляет огромный интерес для использования в медицине, парафармации, и в масложировой пищевой промышленности в целом [88]. Масло чёрного тмина представляет собой маслянистую жидкость светло-жёлтого цвета с пряным запахом. Показатели масла: число омыления - 151, , йодное число – 84, кислотное число - 1,5, эфирное число - 150 [14].

Химический состав семян ч. посевной может изменяться в достаточно широких пределах, в зависимости от условий возделывания и места произрастания. На территории России и СНГ исследования по чернушке в основном проводятся в Ставрополье, Дагестане, Крыму, а также в Беларуси. В состав семян ч. посевной входят жиры (до 50%), эфирные масла (до 1,9%), белки (16-28%), углеводы (24-34%) и другие классы БАС. Описанные для чернушки многочисленные фармакологические эффекты обусловлены именно богатым химическим составом семян (более 100 соединений) [56, 166, 170].

Жирное масло ч. посевной, которое получают методом холодного прессования, состоит преимущественно (до 85% и более) из полиненасыщенных жирных кислот (табл. 1) [65].

Таблица 1 - Жирнокислотный состав масла черного тмина

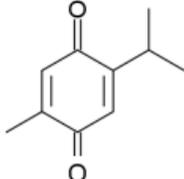
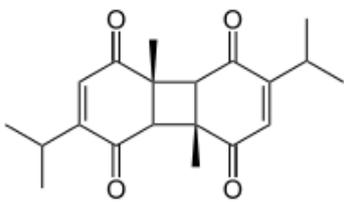
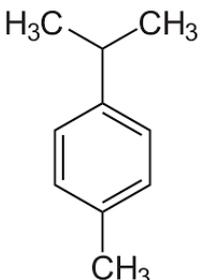
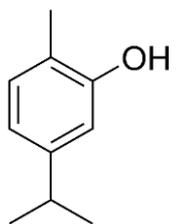
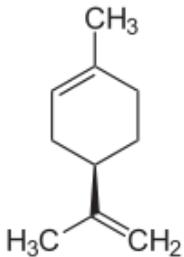
Тривиальное название	Систематическое название	Брутто-формула
<i>Насыщенные жирные кислоты</i>		
Миристиновая кислота	Тетрадекановая кислота	$C_{13}H_{27}COOH$
Пентадециловая кислота	Пентадекановая кислота	$C_{14}H_{29}COOH$
Пальмитиновая кислота	Гексадекановая кислота	$C_{15}H_{31}COOH$
Маргариновая кислота	Гептадекановая кислота	$C_{16}H_{33}COOH$
Стеариновая кислота	Октадекановая кислота	$C_{17}H_{35}COOH$
Арахидиновая кислота	Эйкозановая кислота	$C_{19}H_{39}COOH$
Бегеновая кислота	Докозановая кислота	$C_{21}H_{43}COOH$
Лигноцериновая кислота	Тетракозановая кислота	$C_{23}H_{47}COOH$
<i>Мононенасыщенные жирные кислоты</i>		
Меристоолеиновая кислота	Цис-9-тетрадеценная кислота	$C_{13}H_{25}COOH$
Пальмитоолеиновая кислота	Цис-9-гексадеценная кислота	$C_{15}H_{29}COOH$
Олеиновая кислота	Цис-9-октадеценная кислота	$C_{17}H_{33}COOH$
<i>Полиненасыщенные жирные кислоты</i>		
Линолевая кислота	Цис-, цис-9,12-октадекадиеновая кислота	$C_{17}H_{31}COOH$
Линоленовая кислота	Цис-, цис-, цис-9,12,15-октадекатриеновая кислота	$C_{17}H_{29}COOH$

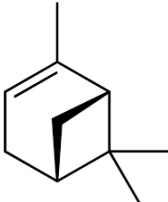
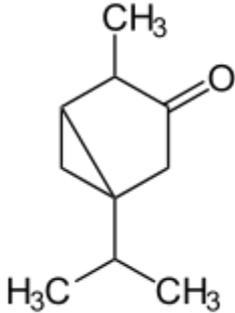
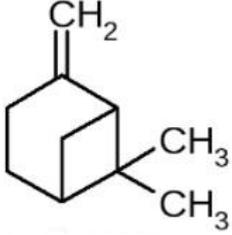
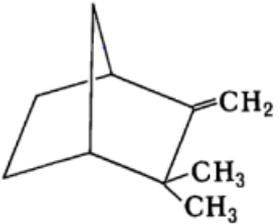
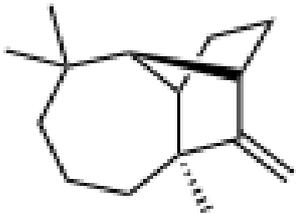
Эйкозодиеновая кислота	цис, цис-11,14-эйкозодиеновая кислота	$C_{19}H_{35}COOH$
Арахидоновая кислота	Цис-, цис-, цис, цис-5,8,11,14-эйкозотетраеновая кислота	$C_{19}H_{31}COOH$

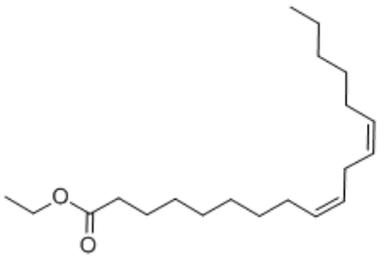
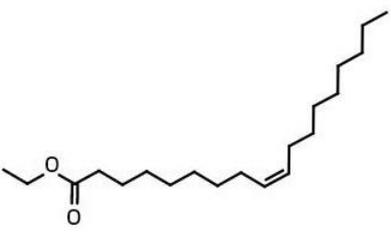
Основными непредельными жирными кислотами в составе масла являются: линолевая кислота (50-65%), олеиновая (15-24%), а также арахидоновая, линоленовая, эйкозодиеновая кислоты, которые являются омега-6 и омега-9 кислотами [43, 74, 115, 160]. Причём на долю линолевой и олеиновой кислот в составе масла обычно приходится до 85% и выше, поэтому масло чернушки относят к полувывсыхающим маслам. Содержание насыщенных жирных кислот (пальмитиновой, стеариновой, миристиновой и т.д.) обычно не превышает 30% [12, 46]. При этом обращает на себя внимание широкая вариабельность данных по жирнокислотному составу различных масел ч. посевной и рода в целом (что послужило основанием для проведения собственных исследований).

Следующим по значимости описанным и изученным компонентом в семенах является эфирное масло, содержание которого колеблется до 1,5 % в зависимости от условий и места произрастания. Химический состав эфирного масла также может варьировать; основным компонентом считается тимохинон, содержание которого может достигать до 57% в нативном эфирном масле. Кроме того, для масла чернушки всё чаще упоминается нигеллон (смесь тимохинона и дитимохинона, иногда как дитимохинон) [96, 103, 123, 188]. Широкое варьирование содержания тимохинона в составе эфирного масла объясняется процессами фотодимеризации тимохинона в дитимохинон и тимогидрохинон, также тимохинон может образовываться в результате окислительной деструкции тимола [28, 109, 112, 140]. В составе масла встречаются *n*-цимен, этиллинолеат, тимогидрохинон, α -пинен, α -туйен, этиллолеат, β -пинен, лимонен, карвакрол, камфен, лонгифолен, 4-терпинеол, сабинен, борнилацетат и другие (табл. 2) [95, 112, 131, 140, 141].

Таблица 2 – Основные химические соединения эфирного масла ч. посевной

№ п/п	Соединение	Структурная формула	Брутто-формула
<i>Ароматические монотерпены и дитерпены</i>			
1	Тимохинон		$C_{10}H_{12}O_2$
2	Дитимохинон		$C_{20}H_{24}O_4$
3	<i>n</i> -Цимен		$C_{10}H_{14}$
4	Карвакрол		$C_{10}H_{14}O$
<i>Моноциклические монотерпены</i>			
5	Лимонен		$C_{10}H_{16}$

<i>Бициклические монотерпены</i>			
6	α -Пинен		$C_{10}H_{16}$
7	α -Туйон		$C_{10}H_{16}O$
8	β -Пинен		$C_{10}H_{16}$
9	Камфен		$C_{10}H_{16}$
<i>Трициклические сесквитерпены</i>			
10	Лонгифолен		$C_{15}H_{24}$

<i>Сложные эфиры жирных кислот</i>			
11	Этиллинолеат		$C_{20}H_{36}O_2$
12	Этилолеат		$C_{20}H_{38}O_2$

Учитывая, что большинство компонентов эфирного масла обладают биологической активностью и растворяются в жирном масле, нами в последующем было уточнено присутствие эфиромасличной фракции в жирном масле растения.

В составе масла ч. посевной присутствуют фосфолипиды, каротиноиды, стерины, хлорофилл. Фосфолипиды масла чернушки представлены фосфатидилхолином, фосфатидилсерином, фосфатидилэтаноламином и фосфатидилинозитолом. Отмечены каротиноиды (метил-ретинола ацетат, дегидроретинол ацетат) и токоферолы (токоферола ацетат) (рис. 7) [88, 150]. Кроме того, для масла чернушки в литературе описаны стерины: ситостерин, холестерин, α -спинастерин, стигмастерин, кампастерин, β -ситостерол, 5-авенастерин, 7-авенастерин [116, 150].

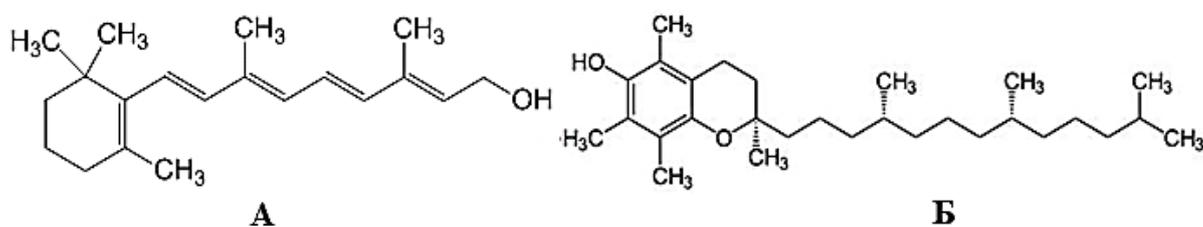


Рисунок 7 – Структурные формулы ретинола (А), альфа-токоферола (Б)

Также для семян ч. посевной установлено количественное содержание углеводов – до 2% [99, 164].

По результатам исследований А.М. Сампиева и соавторов методом капиллярного электрофореза был установлен аминокислотный состав, состав фенольных соединений, органических кислот, минеральных веществ семян ч. посевной [74]. Аминокислотный состав семян представлен свободными и гидролизуемыми аминокислотами. Сумма свободных аминокислот составляет около 100,2-145,1 г/кг и представлены (в г/кг): глицином (15,89-30,89), пролином (22,4-29,1), серином (10,1-17,1), аргинином (0,8-6,4), α -аланином (9,0-14,1), лизиномом (0,7-0,8), валином (14,32-19,42), тирозином (0,01-0,87), треонином (7,4-12,0), метионином (5,9-6,8), лейцином (до 1,7), триптофаном (до 0,25) и гистидином (0,03-0,4). Содержание гидролизуемых аминокислот (г/кг), следующее: глютаминовая кислота – 7,0-12,6, цистеин – 0,01-0,2, аспарагиновая кислота – 5,5-13,8. Сумма гидролизуемых аминокислот составляет 17,8-20,9 г/кг [44, 62].

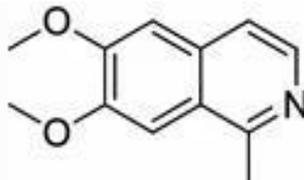
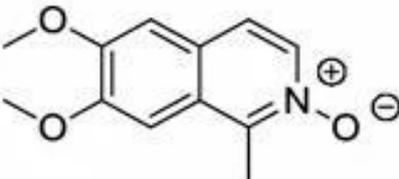
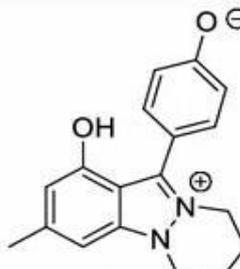
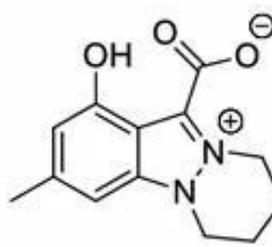
Фенольные соединения представлены (в мг/кг): рутином (218-292), хлорогеновой кислотой (16-82), протокатехиновой кислотой (34-49), кофейной кислотой (168-196) и галловой кислотой (10-37). Общее содержание фенольных соединений составляет - 488-605 мг/кг. Общая сумма органических кислот - 61,82-63,78 мг/кг: аскорбиновая (51,0-55,0), яблочная (0,39-0,78), янтарная (0,04-0,06), лимонная (0,08-0,1), молочная (0,11-0,16), оротовая (6,8-11,1) [65, 74].

Определен также макро- и микроэлементный состав семян ч. посевной (мг/кг): Zn (180-776), Fe (11-150), K (2736-4621), Ca (876-1714), Na (284-467), Mg (303-948), Mn (10-17), Cu (30-94). Стоит отметить, что в семенах растений, культивируемых в РФ, оказалось значительно больше магния, марганца и кальция, а в объектах из Индии и Сирии – калия, цинка, натрия и меди [47, 74].

Семена чернушки содержат специфические алкалоиды - изохинолиновые алкалоиды (нигеллицимин и нигеллицимин-N-оксид, рис. 8)

и индазольные кольцевые алкалоиды (нигеллидин и нигеллицин, табл. 3) [100, 107, 133, 137, 192].

Таблица 3 – Основные алкалоиды семян ч. посевной

№ п/п	Соединение	Структурная формула	Брутто-формула
<i>Изохинолиновые алкалоиды</i>			
1	Нигеллицимин (<i>Nigellimine</i>)		$C_{12}H_{13}NO_2$
2	Нигеллицимин-N-оксид (<i>Nigellimine N-oxide</i>)		$C_{12}H_{13}NO_3$
<i>Индазольные алкалоиды</i>			
3	Нигеллидин (<i>Nigellidine</i>)		$C_{18}H_{18}N_2O_2$
4	Нигеллицин (<i>Nigellicine</i>)		$C_{13}H_{14}N_2O_3$

Зарубежными авторами проводились обширные исследования семян ч. посевной в отношении содержания тритерпеновых сапонинов и установлено наличие следующих: α -хедерин, сативозид А, сативозид В, различные производные хедерагинина – 3-О-[β -D-ксилопиранозил-(1 \rightarrow 3)- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 4)- β -D-глюкопиранозил]-11-метокси-16-гидрокси-17 – ацетоксихедерагинин и 3-О-[β -D-ксилопиранозил-(1 \rightarrow 3)- α -L-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 2)- α -L-арабинопиранозил] хедерагинин и другие [65, 105, 122, 151, 181].

Учитывая богатый химический состав семян ч. посевной, Н.К. Рудь и соавторы провели ряд работ по нормированию качества семян ч. посевной (содержание тимохинона не менее 1,0%), установлен срок годности сырья (2 года). Методом сверхкритической углекислотной экстракции была получена фармацевтическая субстанция, объединяющая разнополярные БАС с прогнозируемыми фармакотерапевтическими свойствами, для которой были предложены в качестве лекарственной формы мягкие желатиновые капсулы с дозировкой 250 мг экстракта. Разработаны показатели и нормы качества для субстанции и лекарственной формы [15, 66, 68, 69].

В последних публикациях по ч. посевной другими авторами был проведен фармакологический скрининг, первично оценены антидиабетический и антиоксидантный потенциал и доказано, что вегетативные части чернушки могут рассматриваться в качестве источника БАС (что рассмотрено в следующем разделе). В надземных частях растения были обнаружены сапонины, флавоноиды, терпеноиды, алкалоиды, стероиды, танины и другие соединения. На основании результатов авторы сделали вывод о перспективности использования вегетативной части растения, помимо репродуктивной [98, 165].

1.3.2. Стандартизация чернушки посевной

Несмотря на отмеченную высокую ценность и популярность, трава и семена ч. посевной не являются фармакопейным сырьём как на территории

нашей страны, так и за рубежом [12, 32]. Наиболее полно ранее изучались только семена растения, также была предложена технология и стандартизация лекарственного препарата из семян ч. посевной – углекислотный сверхкритический экстракт в капсулах [65, 67].

В целом, анализ научного публикационного потока показал недостаточную степень изученности и проработанности вопросов стандартизации травы растения. Опубликованных данных мало для полного спектра представлений о растении и решения вопроса его комплексной переработки. Так, заслуживает внимания работа ученых биотехнологического центра Туниса, в т.ч. посвященная обоснованию спектра фармакологической активности (о чем подробнее – в следующем разделе) с позиций содержания БАС. Ими проведено изучение травы ч. посевной методом ВЭЖХ из абсолютных метанольных экстрактов, в результате чего идентифицированы 14 фенольных соединений, таких как ванилиновая кислота, галловая, транс-коричная кислота, катехин, апигенин и другие. Преобладающим фенольным соединением названа ванилиновая кислота со средней концентрацией 143,21 и 89,94 мг на 100 г сухого веса побегов и корней, соответственно, также отмечена галловая кислота 27,86 мг/100 г в побегах. Установлено суммарное содержание фенольных соединений в побегах и корнях (215 мг/100 г и 135 мг/100 г). Доминирующая группа – это фенолкарбоновые кислоты, где по мнению авторов основными считаются галловая (27,86 мг/100 г) и ванилиновая (143,21 мг/100 г) кислоты [115]. Однако методика, предложенная авторами, трудоемкая, метанольные экстракты токсичны, кроме того, валидация данной методики не проводилась. В соответствии с методикой высушенные образцы побегов (и корней) гидролизовали по модифицированной методике [167]: 40 мл метанола, содержащий бутилированный гидрокситолуол, добавляли к 0,5 г высушенных частей растения, затем добавляли 10 мл 6 М HCl. После перемешивания смеси подвергали звуковой обработке в течение 15 минут и нагревали при 90 °С 2 часа. Далее проводили анализ с использованием жидкостного хроматографа

Agilent Technologies серии 1100 (RP-HPLC), соединенного с многоволновым детектором UV-Vis. Разделение проводилось на 250×4,6-мм, 4-мкм Hypersil ODS C18 обращенно-фазовой колонке. Подвижная фаза состояла из ацетонитрила (растворитель А) и воды с 0,2% серной кислоты (растворитель В). Всего авторами были описаны 14 соединений – 8 фенольных кислот (доминирующие соединения – галловая и ванилиновая кислоты) и 6 флавоноидов (катехин, апигенин, кверцетин и другие), также установлены антиоксидантный и антимуtagenный эффекты экстрактов.

Перспективность применения в медицинских целях вегетативных частей ч. посевной с позиции химического состава также подтвердили исследователи из Пакистана [97, 98], которые провели фитохимический скрининг гексановых экстрактов надземной части растения методом ГХ-МС – регистрировали время удерживания, процентную площадь пиков и сходство с библиотекой NIST 27, с помощью которой были определены вероятные соединения и их структуры. Авторами описаны 9 соединений из вегетативной части, и 11 соединений – из репродуктивной части. Результаты показали наличие пальмитиновой кислоты, линолевой кислоты, октадеценовой кислоты, стеариновой кислоты, октадекадиеновой кислоты, эйкозодиеновой кислоты и фталевой кислоты в переменных количествах, на сопоставимых уровнях в обеих частях (вегетативной и репродуктивной). Общее содержание фенолов определялось колориметрически и выражалось в галловых эквивалентах. Галловая кислота была использована для стандартизации и определения общего содержания фенолов в экстрактах. Этилацетатный экстракт вегетативной части дал самое высокое содержание фенолов ($616 \pm 0,03$ мкг/г) при 200 мг/мл, в то время как гексановый экстракт был самым низким с $300 \pm 0,15$ мкг/г фенольных соединений при концентрации 1,56 мг/мл. Для семян - экстракт на петролейном эфире дал $823 \pm 0,01$ мкг/г эквивалентов галловой кислоты (самый высокий показатель), в то время как бутаноловый экстракт был наименьшим по содержанию фенолов ($330 \pm 0,02$ мкг/г) среди всех растворителей при концентрации 1,56 мг/мл [98].

Принимая во внимание малую изученность травы ч. посевной отечественными и зарубежными исследователями, а также явную противоречивость в способах количественного определения суммы флавоноидов в траве ч. посевной, представляется важным последующее проведение опытов в данном направлении, в том числе в изучении флавоноидного состава потенциально возможного лекарственного растительного сырья «Чернушки посевной трава».

1.3.3. Фармакологические свойства чернушки посевной и применение в медицинской практике

История применения ч. посевной в лечебных целях, как упоминалось, насчитывает более 2000 лет. Традиционно для лечения различных заболеваний использовались семена и масло из них. Установлено, что семена и масло семян обладают различными фармакологическими свойствами, среди которых наиболее часто описываются следующие: антиатеросклеротическое, противоаллергическое, противогельминтное, бронхолитическое, анальгетическое, антибактериальное, противовоспалительное, антиоксидантное, антидиабетическое, противоопухолевое, спазмолитическое, гастро- и гепатопротекторное [25, 137, 158, 164].

Высокая фармакологическая активность масла семян ч. посевной объясняется прежде всего высоким содержанием полиненасыщенных жирных кислот и терпеноидной фракции (эфирным маслом). Соответственно, в процессе извлечения жирного масла из семян чернушки методом холодного прессования вместе с жирными кислотами происходит выход и некоторых составляющих эфирного масла, таких как тимохинон, *n*-цимол и других компонентов. Стоит отметить, что учеными исследованы и доказаны свойства линолевой кислоты по стабилизации клеточных мембран клеток, а эйкозеновая и эйкозодиеновые жирные кислоты являются предшественниками простаноидов (простагландинов), которые мешают течению воспалительных процессов в организме [65, 182].

Содержащиеся в жирном масле эссенциальные жирные кислоты (омега-6 и омега-9) оказывают ряд положительных эффектов на организм: они снижают риск появления атеросклероза путём снижения уровня липопротеидов низкой плотности и повышения липопротеидов высокой плотности [126, 160, 164, 182]; оказывают общее антиоксидантное действие, препятствуя развитию оксидативного стресса в организме [137, 148, 186]; также участвуют в обеспечении гепатопротекторной активности [142, 147].

Масло чернушки оказывает профилактическое и лечебное действие при сахарном диабете, снижая вероятность морфологических изменений и сохраняя целостность поджелудочной железы, что в конечном итоге позволяет нормализовать уровень сахара в крови пожилых пациентов. В основе данного антидиабетического действия растения лежит его способность влиять на процесс глюконеогенеза в печени, снижая его активность [25, 108, 128, 157]. Так, для лечения диабетических язв в Индонезии используют гель NSO - *Nigella sativa oil* [178].

Другой, не менее важный компонент, содержащийся в семенах чернушки, – тимохинон, обладает широкой палитрой фармакологических свойств. В сумме с эссенциальными жирными кислотами оказывают гипотензивное действие, также извлечения из семян способны повышать гематокрит и гемоглобин, снижать уровень холестерина, оказывать спазмолитическое действие [17, 101, 115, 120, 156, 168].

Сообщается, что эфирное масло обладает сильной антибактериальной активностью против грамположительных (*Staphylococcus aureus*) и грамотрицательных (*Pseudomonas aeruginosa* и *Escherichia coli*) бактерий. Также показывает синергетический эффект со стрептомицином и гентамицином, в то время как аддитивный проявляется со спектиномицином, эритромицином, тобрамицином, доксициклином, хлорамфениколом, налидиксовой кислотой, ампициллином, линкомицином и ко-тримоксазолом и аналогичен топическому мупироцину [51]. Описана активность против многих мультирезистентных грамположительных и грамотрицательных бактерий

[102, 104, 106, 130, 179]. Исследователи полагают, что данные свойства обусловлены высоким содержанием тимохинона, в частности, тимогидрохинона [114, 145]. Кроме того, доказано противогрибковое действие против *Candida albicans* и *Madurella mycetomatis*, *Aspergillus niger*, *Fusarium solani* и *Scopulariopsis brevicaulis*, где активность была отмечена выше, чем амфотерицин-В и гризеофульвин. Тимохинон и тимогидрохинон продемонстрировали противогрибковый эффект против многих клинических изолятов, включая дерматофиты, плесени и дрожжи [102, 155].

Экстракты из семян ч. посевной могут быть использованы в качестве антималярийного средства, противовирусного средства [17, 51, 102, 185]. Особый интерес вызывают последние исследования ряда ученых, показывающих большую перспективность чернушки посевной в профилактике и лечении COVID-19, что еще раз подтверждает уникальность этого растения [51, 153, 191].

Стоит также упомянуть, что масло чернушки оказывает бронхолитический и антигистаминный эффекты, что может защитить от приступов астмы. Исследователями установлено, что нигеллон, являющийся компонентом эфирного масла чернушки, служит ингибитором формирования гистаминов, что при определенных заболеваниях может стать полноценной заменой кортикостероидным лекарственным средствам [152, 161]. Используется масло также при лечении дерматологических заболеваний, связанных, прежде всего, с нейрогуморальными и гистаминными нарушениями [65, 110, 111, 161].

Для чернушки в научной литературе описаны и другие фармакологические свойства: выведение из организма радионуклеидов, солей тяжелых металлов и различных токсинов; положительное влияние на функционирование тимуса, стимулирование выработки интерферона; применение в лечении опиоидной и никотиновой зависимости, стимулирование лактации у кормящих женщин [1, 25, 62, 77, 176].

Также для препаратов из семян растения описаны различные защитные эффекты против нейродегенеративных заболеваний (болезнь Альцгеймера и Паркинсона, рассеянный склероз) и при черепно-мозговых травмах. Масло действует как антиконвульсантное, анксиолитическое, антипсихотическое, антидепрессантное и ноотропное средство [88, 129, 139, 177].

Ряд отечественных авторов [45, 65] ссылаются на исследование Национального института рака (Sidney Kimmel Cancer Center, США), который относит масло чернушки к противораковым средствам. Тимохинон оказывает ингибирующее действие на воспалительные цитокины, что ведет к снижению роста раковых клеток [121, 173]. Изучение и применение тимохинона на организмах животных выявили как снижение объема опухоли, так и общее значимое снижение вредных цитокинов [132, 138, 159, 171, 190].

Для представителей рода нигеллы опытным путем доказано наличие в семенах фермента липазы, которая ускоряет распад триглицеридов в пищеварительном тракте. Ранее выпускался лекарственный препарат «Нигедаза» для терапии заболеваний пищеварения (панкреатит, холецистопанкреатит, хронический гастрит, гепатит и др.), который помогал пациентам справиться со сниженной или отсутствующей липолитической активностью дуоденального сока. Для получения препарата использовали семена ч. дамасской, так как они содержат больше липазы [17, 32, 46]. Однако масло ч. посевной также положительно действует на работу желудочно-кишечного тракта - способствует устранению дисбактериоза, препятствует развитию ожирения, благотворно влияет на аппетит [65, 137, 164, 176].

Как отмечалось в предыдущем разделе, анализ научной литературы показывает, что надземная часть растения – трава, а также корни, несмотря на меньшую изученность, имеют перспективную фармакологическую активность. Так, Шарофова М.У. с соавторами провели исследование антидиабетических свойств надземных частей ч. посевной на

экспериментальной модели диабета у животных. Оказалось, что настой и отвар (из травы и семян, соответственно) оказывают значительное антидиабетическое действие, демонстрируя также антиатеротогенную, гепато- и нефропротекторную активность. При сравнении настоя и отвара на основе сырья ч. посевной выявлено схожее влияние на различные показатели, такие как рН крови, уровень глюкозы и гликолизированного гемоглобина. Более высокую активность в отношении функциональной активности печени (уровень общего белка, липиды, ферменты и билирубин) оказывал настой травы ч. посевной [87].

Последние исследования зарубежных ученых также подтверждают, что воздушные части ч. посевной обладают антиоксидантными и антидиабетическими свойствами за счёт содержания флавоноидов и тритерпеновых сапонинов [98, 165].

Исследователи из биотехнологического центра Туниса установили антимуtagenную активность метанольных экстрактов корней и побегов ч. посевной: корни показали сопоставимую и сильную супероксидную активность, однако побеги продемонстрировали более высокую активность по поглощению 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил радикалов, восстанавливающую и хелатирующую активность, чем корни. Мутагенная и антимуtagenная активность были определены с помощью теста Эймса. Побеги и корни продемонстрировали значительный антимуtagenный эффект [65, 113].

1.3.4. Селекция, культивирование и агротехника чернушки посевной

В Российской Федерации по данной теме изучались различные виды чернушки, а также проводился их интродукционный анализ в Горном ботаническом саду ДНЦ РАН, где ч. посевная успешно прошла испытания [83]. Также ч. посевную заготавливают в Краснодарском крае, Республике Адыгея и других регионах [67]. Как отмечалось, активно изучением чернушки занимаются в Республике Беларусь в Белорусской государственной сельскохозяйственной академии и Центральном ботаническом саду НАН

Беларуси, где ранее был выведен целый ряд сортов как ч. посевной, так и дамасской [62, 89].

Ч. посевная свето- и теплолюбивое растение, засухоустойчивое, имеет продолжительный период вегетации. Несмотря на неприхотливость, затенение до 75% продлевает вегетацию, уменьшает фитомассу. Оптимальная температура для условий произрастания около 24°C. Лучшие почвы для выращивания ч. посевной – по кислотности нейтральные, чистые от сорняков, рыхлые и умеренно увлажненные. Растение хорошо реагирует на применение удобрений: азотные удобрения увеличивают количество цветков при дозировке 60 кг/га и, соответственно, получаемых коробочек с семенами [125, 149, 180].

Исследования Н.М. Найда и соавторов показывают, что выращивание ч. посевной в Российской Федерации также возможно: ранее в Ленинградской области выращивали ч. посевную, которая имела вполне нормальный рост и развитие в данных почвенно-климатических условиях. Длительность вегетационного периода достигала 140-145 дней. Однако в условиях Сирии морфометрические и биологические показатели растения значительно превышали соответствующие показатели в Ленинградской области. Зафиксировано, что в наименьшей степени менялись цветок и плод чернушки. Было отмечено, что в условиях Ленинградской области ч. посевную вполне возможно выращивать как пряно-вкусовую культуру, а в удачный сезон – для получения жирного масла [52, 90, 91, 92].

В статье белорусских исследователей ГНУ «Центральный ботанический сад НАН Беларуси» также представлены результаты интродукционного изучения ч. посевной в Центральном ботаническом саду. Вид при культивировании в Беларуси проходит полный вегетационный период и дает полноценные жизнеспособные семена, отличающиеся качественным биохимическим составом. Так был выведен сорт Славянка, отличающийся сокращением вегетационного периода с 145 до 130 дней и повышенным содержанием тимохинона (до 4,4%) [23, 24, 89].

Посев ч. посевной обычно следует проводить ранней весной. Рекомендуемый способ посева - широкорядный (около 45 см) или возможен ленточный (20+50 см). Норма высева – 10-15 кг/га с глубиной заделки семян около 2-3 см. При температуре 5-6°C семена начинают уже прорастать. Если сохраняется данная температура, то всходы появляются на 14-15 день, а при 7-10°C – на 6-8 день. Всходы вполне легко переносят небольшие заморозки. Стоит отметить, что посев рассадным способом также возможен [29, 62].

Согласно агорекомендациям по срокам сбора сырья существует 2 подхода: сбор семян производить после пожелтения нижних листьев растения и побурения плодов; по другим сведениям – оптимален сбор сырья при однофазной уборке в фазе твердой спелости при влажности ниже 24% [38, 18]. Стоит упомянуть о получении высоких урожаев семян в Турции на орошаемых землях и в Иране при применении наноконпозиций, содержащих Fe + Zn + Mn, в фазах удлинения стебля и начале цветения [162, 174].

Таким образом, наиболее перспективным видом для углубленного изучения (исходя из имеющихся данных по содержанию БАС, спектра активности, а также перспектив возделывания на территории России) нам представляется чернушка посевная.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ I

1. Данные научной литературы показывают целесообразность комплексного использования чернушки посевной и необходимость изучения наряду с жирным маслом и травы растения (в качестве перспективного вида лекарственного растительного сырья).
2. Химический состав травы чернушки посевной углубленному изучению не подвергался, но, по имеющимся данным, основные БАС представлены соединениями фенольной природы: группой фенолкарбоновых кислот (доминируют ванилиновая и галловая кислоты) и флавоноидами (доминируют апигенин, кверцетин, рутин, катехин и др.); присутствуют терпеноиды, тритерпеновые сапонины, алкалоиды, танины, остатки жирных кислот, аскорбиновая кислота.
3. В спектре биологических и фармакологических свойств травы чернушки посевной описаны антиоксидантные, антидиабетические, антимуtagenные, гепато- и нефропротекторные виды активности.
4. Необходимо совершенствовать подходы к анализу травы чернушки посевной и для этих целей детально исследовать химический состав сырья, установить диагностически значимые вещества, обосновать выбор методов и веществ-стандартов, разработать методики качественного и количественного анализа.
5. Следует продолжить работы в рамках комплексного подхода к переработке растения по сравнительному изучению масла растений различных регионов произрастания, соотнесения жирнокислотного профиля и некоторых видов активности, решения вопросов доброкачественности популярного и дорогостоящего продукта, а также для получения отечественных лекарственных препаратов.
6. Необходим проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Чернушки посевной трава» для появления возможности применения сырья чернушки посевной в фармацевтической и медицинской практике.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

Объектами исследования являлись:

- свежая и высушенная трава чернушки посевной (*Nigella sativa* L.) на разных стадиях развития, культивируемая на территории Самарской и Ульяновской областей с 2020 по 2022 гг.;
- образцы масел чернушки посевной (масел черного тмина холодного отжима) промышленного производства 2019-2021 гг. различного географического происхождения (Египет, Пакистан, Саудовская Аравия, Россия)
- водно-спиртовые извлечения травы ч. посевной на различных концентрациях спирта этилового (40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %);
- настойка травы ч. посевной на 70% спирте этиловом в соотношении «сырье-экстрагент» 1:5;
- индивидуальные вещества: никотифлорин (3-О-β-D-глюкопиранозид кемпферола), рутин (3-О-β-D-глюкопиранозид кверцетина), нигелфлавонозид G (3-О-β-D-[α-L-О-рамнопиранозил-(1→6)]-глюкопиранозид-[(2→1)-О-β-D-глюкопиранозил-(2→1)-О-β-D-глюкопиранозил]-3,5,6,7,4'-пентагидрокси-3'-метоксифлавона), даукостерин (3-О-β-D-глюкопиранозид β-ситостерина), β-ситостерин.
- стандартные образцы: рутин (CAS 153-18-4, ≥95 %, MERK), кемпферол (CAS 520-18-3, ≥95 %, MERK), кверцетин (CAS 849061-97-8, ≥98 %, MERK), никотифлорин (CAS 17650-84-9, ≥98 %, MERK), β-ситостерин (CAS 83-46-5, ≥95 %, MERK);
- препараты и образцы сравнения (промышленного производства): масляный раствор альфа-токоферола ацетата (300 мг/мл), настойка эвкалипта (70% спирт этиловый), спирт этиловый марки х.ч. (40%, 70%, 96%).

Основные оборудование и материалы, используемые в ходе выполнения диссертационной работы представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Основные оборудование и материалы

№ п/п	Тип прибора	Марка, модель, страна производства
1	Цифровой микроскоп (кратность увеличения: 40х, 100х, 400х)	Zeiss Primo Star, Германия
2	Цифровой стереомикроскоп (кратность увеличения: 20х, 40х)	Motic DM-39C-N9GO, Китай
3	Люминесцентный микроскоп (светофильтры - 420-550 нм и 330-400 нм, кратность увеличения: 40х, 100х, 400х)	Альтами ЛЮМ 2, Россия
4	Весы аналитические	Сартогосм ЛВ 210-А, Россия
5	Весы технические	ВСМ-1, ВСМ-5, ВСМ-20, ВСМ-100, Россия
6	Спектрофотометр	Analytik Jena «Specord 40», Германия
7	Спектрофотометр	ОКБ Спектр «СФ-2000», Россия
8	Спектрометры: • для ^1H -ЯМР спектроскопии (399,78 МГц) • для ^{13}C -ЯМР спектроскопии (100,52 МГц)	JNM-ECX 400, Япония
9	Масс-спектрометр (ESI)	Bruker microTOF II, США
10	Газовый хроматограф с масс-спектрометрическим детектором (капиллярная кварцевая колонка HP-5ms 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм, неподвижная фаза: 5%-дифенил-95%-диметилсилоксан)	МАЭСТРО 7820 (хроматограф), Россия Agilent 5975 (детектор), США Agilent (колонка), США
11	Хемилюминометр	ОАО Бикап, ХЛМ-3, Россия
12	Облучатель ультрафиолетовый	ТСХ-254/365, Россия
13	Аквадистилятор	ЭМО ДЭ-4-02, Россия
14	Термостат лабораторный	СПУ ТС-1/80, Россия
15	Шкаф сушильный	2В-151, Россия

17	Ротационный испаритель	Labtex ИР-1ЛТ, Россия
18	Пластины для ТСХ	Sorbfil, ПТСХ-АФ-А-УФ, Россия
19	Лабораторная посуда по ГОСТ 25336-82	ПАО Химлаборприбор и др. (стаканы, колбы, цилиндры и пр.), Россия
20	Фильтры обеззоленные	МЕЛИОР XXI «Красная лента» «Синяя лента» (ТУ 2642-001-68085491-2011), Россия
21	Фильтровальная бумага для хроматографии	FN-11 и FN-15, Россия
22	Набор сит (1, 2, 3, 5 мм)	Химприбор, Россия

Также в ходе исследования использовались различные реактивы и сорбенты, основные из которых представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Основные реактивы и сорбенты

№ п/п	Наименование	Производитель
1	Трихлорметан (марки ХЧ) по СТП ТУ СОМР 2-028-06,	ООО «Компонент-Реактив», Россия
2	Спирт этиловый 96 % (марки ХЧ, серия: 360919)	ООО «Гиппократ», Россия
3	Ацетонитрил (для ВЭЖХ) по ТУ СОМР 3-074-06	ООО «Компонент-Реактив», Россия
4	Гексан (марки ХЧ) СТП ТУ КОМП 2-557-13	ООО «Компонент-Реактив», Россия
5	Ацетон (марки ХЧ) по ТУ 2633-018-44493179-98	АО «Экос-1», Россия
6	Бутанол-1 (марки ХЧ) по ТУ 2632-021-44493179-98	АО «Экос-1», Россия
7	Кислота уксусная ледяная (марки ХЧ) по ГОСТ 61-75	АО «Экос-1», Россия
8	Хлористоводородная кислота (марки ХЧ) по ГОСТ 3118-77	ООО «База № 1 Химреативов», Россия

9	Серная кислота (марки ХЧ) по ГОСТ 4204-77	ООО «База № 1 Химреативов, Россия
10	Сорбенты для колоночной хроматографии: <ul style="list-style-type: none"> • силикагель КСК L 50/100 мкм по ТУ 6-09-39-23-86; • полиамид (for column chromatography); • сефадекс LH-20 	<ul style="list-style-type: none"> • ООО «ИМИД», Россия • Sigma-Aldrich (Merck), Германия • Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Швеция

Используемое основное программное обеспечение:

- Пакет Microsoft Office 2019;
- Программы для работы с цифровыми микроскопами: Zen Imaging Software – ZEN 3.0 (blue edition) и Motic Images Plus 2.0 ML;
- Программы для работы со спектрофотометром: WinASPECT (version 2.1.1.0) и «Сканирование для спектрофотометра СФ-2000» (версия 4.06);
- Встроенное программное обеспечение для других приборов (МАЭСТРО 7820, Agilent 5975, JNM-ECX 400, Bruker micrOTOF II, ХЛМ-3);
- Библиотека масс-спектров NIST MS Search Software version 2.0;
- KingDraw v 3.0 for Windows и другие.

2.2. Методы исследования

В диссертационной работе применяли различные современные методы анализа как исходного ЛРС, так и субстанций, лекарственных и пищевых растительных масел, получаемых из сырья ч. посевной (микроскопические методы анализа, ТСХ-анализ, УФ-спектрофотометрия, ГХ-МС, ЯМР-спектроскопия и масс-спектрометрия, флуориметрия и другие). Также были проведены исследования фармакологической активности изучаемых объектов: антиоксидантной активности на 2 модельных системах (система с генерацией АФК и ПОЛ), антибактериальной и противогрибковой активности макрометодом с использованием штаммов микроорганизмов, доклинические исследования (острая токсичность) на животных.

2.2.1. Методы микроскопического анализа

В работе проводили исследования свежей и высушенной травы ч. посевной. Сушку проводили естественным путем, без попадания прямых солнечных лучей на сырьё. Пробоподготовку сырья и микропрепаратов проводили в соответствии правилами, установленными нормативной документацией - ГФ РФ XIV издания [12, 31]. Предварительно части свежесобранного и высушенного сырья травы ч. посевной фиксировали в смеси веществ глицерина очищенного – этанола – воды очищенной в соотношении 1:1:1, далее проводили морфолого-анатомический и гистохимический анализ в соответствии с требованиями ОФС.1.5.1.0002.15 «Травы» по ГФ РФ XIV издания [12]. Проводили органолептическую оценку сырья по основным показателям: цвет, размеры, запах, вкус. Образцы сырья просматривали визуально и с использованием лупы под увеличением $\times 10$.

Анатомо-гистологический анализ признаков лекарственного растительного сырья ч. посевной проводили с помощью цифровых микроскопов в проходящем свете (Zeiss Primo Star и Motic DM-39C-N9GO) и люминесцентного микроскопа (Альтами ЛЮМ-2, светофильтры - 420-550 нм и 330-400 нм) с источником света - высоковольтной ртутной лампой (НВО 100Вт). Гистохимический анализ проводили с использованием 1% раствора сернокислого анилина – на лигнифицированные и одревесневшие оболочки (желтый цвет), и спиртовой раствор Судана III – на кутинизированную эпидерму (кутин окрашивается в розовый цвет) [2, 12].

2.2.2. Методы химического анализа

В качественном анализе сырья и водного-спиртовых извлечений для установленного химического состава применяли различные пробирочные реакции на основные группы БАС (раствор железа (III) хлорида, раствор алюминия (III) хлорида, раствор диазобензолсульфокислоты, цианидиновая реакция, реакция Вильсона, реакции гидролиза) [32, 33].

2.2.3. Хроматографические методы анализа

Тонкослойная хроматография

Данный метод анализа использовали для качественной оценки химического состава водно-спиртовых извлечений и препаратов из травы ч. посевной [12, 32, 33].

В качестве основных хроматографических носителей использовали пластинки марки «Sorbfil» (ТСХ-АФ-А-УФ), предварительно высушенные в термостате при температуре 95-105°C для удаления влаги из сорбента. Применяли различные системы растворителей: хлороформ – 96% спирт этиловый (4:1, 6:1 и 9:1) и хлороформ - 96% спирт этиловый - вода (25:18:2), подготовленные не менее чем за 24 ч. до хроматографирования.

На намеченную стартовую линию наносили испытуемые образцы и растворы стандартных образцов с помощью капилляров. Хроматографирование проводили при комнатной температуре восходящим способом. При достижении фронтом растворителя в пределах 7-8 см, пластинки извлекали из системы и просматривали при дневном освещении и УФ-свете при $\lambda=254$ и 365 нм. Для обнаружения фенольных, в частности, флавоноидных соединений обрабатывали пластинки растворами $AlCl_3$ (с концентрацией 3%) и щелочным раствором ДСК.

Жидкостная адсорбционная хроматография (колоночная хроматография) [16, 32, 70]

Данный метод использовали для исследования химического состава травы ч. посевной. Параметры хроматографического разделения на колонке: высота и диаметр сорбента 6 см и 8 см, соответственно. В исследовании использовали: неподвижная фаза - силикагель марки L 50/100 мкм, элюенты – хлороформ, спирт этиловый 96%, вода очищенная, смеси спирта этилового и хлороформа в различных концентрациях.

После проведения колоночной хроматографии, полученные фракции подвергали очистке; использовали следующие сорбенты: силикагель

указанной выше марки, полиамид для колоночной хроматографии, сефадекс LH-20 [16].

Газовая хромато-масс-спектрометрия (ГХ-МС) [8, 12, 32]

Методом газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием после перевода жирных кислот в метиловые эфиры по методике ГОСТ 31665-2012 переэтерификацией с метанольным раствором калия гидроксида проводили изучение жирнокислотного состава масел чернушки посевной [11, 49]. В работе использовали газовый хроматограф «МАЭСТРО 7820» с масс-спектрометром модели Agilent 5975 и автоинжектором. Использовали капиллярную кварцевую колонку Agilent HP-5ms с параметрами 30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм (длина × внутренний диаметр × толщина пленки неподвижной фазы). Неподвижная фаза – Agilent 5%-дифенил-95%-диметилсилоксан [49].

Условия хроматографирования [49]:

- газ-носитель - гелий, скорость газа-носителя - 1 мл/мин;
- температура термостата колонок: 50 °С в течение 1 мин; нагрев до 180 °С со скоростью 15 °С/мин; нагрев до 280 °С со скоростью 4 °С/мин; 280 °С в течение 5 мин;
- температура испарителя - 280 °С; температура источника ионов - 150 °С; температура квадруполя - 230 °С; температура переходной камеры - 280 °С;
- объем вводимой пробы - 1 мкл с делением потока.

Для идентификации компонентов масел определяли линейные индексы удерживания, масс-спектры сопоставляли с данными из библиотеки масс-спектров «NIST 2.0» и литературными данными. Рассматривались только компоненты, определяемые по библиотеке с вероятностью более 90% [49]. Долю компонентов рассчитывали методом внутренней нормализации по площадям соответствующих пиков на хроматограмме, построенной по полному ионному току. Для каждого образца проводилось по 3 измерения.

2.2.4. Спектральные методы анализа

Прямая и дифференциальная УФ-спектрофотометрия [12, 33]

Метод абсорбционной спектроскопии в варианте УФ-спектрофотометрии использовали для определения содержания суммы флавоноидов в изучаемых образцах извлечений из травы ч. посевной и анализа индивидуальных соединений, полученных в ходе колоночной хроматографии. Анализ проводили на спектрофотометрах – СФ-2000 и Specord-40, кюветы – 10 мм, диапазон определения длин волн – 190-1000 нм [50]. Измерения максимумов поглощения проводили в прямом варианте спектрофотометрии, после добавления специфического комплексообразователя с флавоноидами (3% спиртового раствора $AlCl_3$) и в дифференциальном варианте.

Далее проводили обработку результатов с помощью приборных и статистических программ [7].

ЯМР-спектроскопия и масс-спектрометрия [12]

Спектральные характеристики выделенных веществ определяли путем регистрации 1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР спектров с помощью прибора JNM-ECX 400 (399,78 и 100,52 МГц, соответственно).

Масс-спектры были зарегистрированы на приборе Bruker micrOTOF II методом электрораспылительной ионизации (ESI) с данными параметрами:

- измерение на положительных ионах (с напряжением на капилляре – 4500 V);
- газ-распылитель – азот (4 л/мин);
- проба: ввод вещества в метанольном растворе шприцевым методом, скорость потока – 3 мкл/мин;
- температура интерфейса – 180 °С;
- диапазон сканирования: 50-3000 (m/z).

Определение температуры плавления веществ осуществляли на блоке Кофлера.

2.2.5. Технологические методы

Настойку из травы ч. посевной получали на 70% спирте этиловом методом модифицированной дробной мацерации в трех экстракторах (в соотношении «сырье – экстрагент» как 1:5 после предварительного замачивания сырья двумя объемами экстрагента) с включением заключительной термической стадии – 30 минут при температуре 70°C [51]. Полученное извлечение отстаивали в течение 2 суток при температуре 8°C в защищенном от света места и профильтровывали через фильтр обеззоленный «Красная лента». Фасовали во флаконы светозащитного стекла, укупоривали полиэтиленовыми пробками с навинчивающейся крышкой. Данный способ получения настоек оптимален для получения настоек из различных видов сырья, содержащих фенольные соединения [12, 57].

Органолептические свойства «Чернушки травы настойки»: темно-коричневая прозрачная слегка опалесцирующая жидкость с травяным запахом и пряно-травяным вкусом.

2.2.6. Фармакологические методы исследования

Антимикробная и противогрибковая активность извлечений травы чернушки посевной

Исследованию подвергались водно-спиртовые извлечения травы ч. посевной на различных концентрациях спирта этилового (40%, 70%, 96%) в соотношении «сырье – экстрагент» (1:30) и настойка травы чернушки посевной на спирте этиловом 70% в соотношении «сырье – экстрагент» (1:5) [51].

В качестве тестовых культур были использованы штаммы Американской коллекции типовых культур (American Type Cultures Collection - ATCC): *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), а также *Candida albicans* (клинический штамм). Клинический штамм *Candida albicans* был выделен из мокроты от пациента с бронхолегочной патологией в структурном подразделении ФГБОУ

ВО СамГМУ Минздрава России «Клиники СамГМУ», исследование проводилось в соответствии с одобрением Комитета по биоэтике при вузе (протокол № 196 от 31 октября 2018 года) [51]. Определение минимальной ингибирующей концентрации (МИК) проводили методом двойных серийных разведений в бульоне (пробирочный, макрометод) в соответствии с методиками, описанными в методических указаниях (МУК) 4.2.1890-04 в питательной среде - бульон Мюллера-Хинтона [54, 127]. Препаратом сравнения с установленной антимикробной активностью являлась настойка эвкалипта на спирте этиловом 70% промышленного производства [51]. Подробное описание методики проведения анализа представлено в таблице 6.

Таблица 6 – Методика анализа антимикробной и противогрибковой активности

Основные этапы	Описание этапа
<i>Приготовление рабочего раствора</i>	Питательный бульон разливался по 0,5 мл в каждую пробирку. Исследуемый образец в количестве 0,5 мл при помощи микропипетки со стерильным наконечником вносили в первую пробирку, содержащую 0,5 мл бульона. Затем тщательно перемешивали и новым стерильным наконечником переносили 0,5 мл раствора тестируемого образца в бульоне во вторую пробирку, содержащую первоначально 0,5 мл бульона - таким образом получали ряд разведений с 1:2 до 1:128 [51].
<i>Приготовление инокулюма</i>	Для инокуляции использовали стандартную микробную взвесь, эквивалентную 0,5 ед. по стандарту МакФарланда, разведенную в 100 раз на питательном бульоне, после чего концентрация микроорганизма в ней составили примерно 10^6 КОЕ/мл. По 0,5 мл инокулюма вносили в каждую пробирку, содержащую по 0,5 мл соответствующего разведения тестируемого образца и в одну пробирку с 0,5 мл питательного бульона без образца («отрицательный» контроль). Инокулюм вносился в пробирки с разведениями образца не позднее 15–30 мин с момента его приготовления [51].
<i>Оценка роста микроорганизмов и результатов экспериментов</i>	Для определения наличия роста микроорганизма пробирки с посевами просматривали в проходящем свете. Рост культуры в присутствии тестируемого образца проводили при сравнении с пробиркой «отрицательного» контроля, содержащей исходный инокулюм и хранившейся в холодильнике. МИК определяли по наименьшей концентрации тестируемого образца, которая

	подавляет видимый рост микроорганизма. Количество повторений каждого эксперимента было равно <i>трём</i> [51].
--	--

Антиоксидантная активность масел чернушки посевной [12, 81]

Методом регистрации хемилюминесценции на хемилюминометре ХЛМ-3 (Россия) в системах, моделирующих процессы выработки АФК и ПОЛ определяли сравнительную антиоксидантную активность образцов масел ч. посевной [49] (табл. 7).

Таблица 7 – Описание используемых модельных систем

Параметры систем	Модельная система АФК	Модельная система ПОЛ
<i>Пробоподготовка</i>	Исследуемые образцы были растворены в диметилсульфоксиде в соотношении: 0,2 мл исследуемого образца в 1 мл полученного раствора [49].	были растворены в соотношении: 0,2 мл исследуемого образца в 1 мл полученного раствора [49].
<i>Состав системы</i>	20 мл фосфатного буфера (20 мМ KH_2PO_4 , 105 мМ KCl) с добавлением раствора люминола (10–5 М) и цитрата натрия (50 мМ). Полученный раствор МС доводили до $\text{pH}=7,45$ [49].	Липиды куриного желтка, полученные путём гомогенизирования куриного желтка в фосфатном буфере в соотношении 1:5 и последующим разбавлением в 20 раз и отбором 20 мл [49].
<i>Инициирование реакции</i>	Добавление в систему 1 мл 50 мМ раствора Fe^{2+}	

Далее проводили регистрацию интенсивности свечения в течение 5 мин при постоянном перемешивании. Основными наиболее информативными характеристиками хемилюминесценции (ХЛ) служили светосумма свечения, определяемая по интенсивности излучения, и амплитуда максимального свечения [49, 81].

В качестве контроля служили модельные системы (МС) без добавления исследуемых препаратов (в тех же объемах добавляли физиологический раствор), с добавлением диметилсульфоксида - ДМСО (контроль+ДМСО), а также масляный раствор альфа-токоферола ацетата [49]. Для изучения

дозированного влияния образцов использовали 2 дозировки приготовленных растворов образцов – по 0,1 и 0,5 мл.

Инактивация генерации активных форм кислорода и общее снижение свободнорадикальных реакций в системах обуславливает способность исследуемых образцов проявлять антиокислительную защиту и возможность использования их в качестве средств-антиоксидантов [6, 73, 85].

Изучение острой токсичности настойки травы чернушки посевной [71]

Проводилось изучение острой токсичности разработанного препарата «Чернушки травы настойка» (1:5) на 2 группах беспородных половозрелых крыс-самцов массой 200-220 г. (по 10 животных в каждой группе). Животных содержали в условиях вивария с обычным рационом питания и открытым доступом к водному источнику. Первая группа однократно внутрижелудочно получала исследуемый препарат в дозе 0,2 г/кг на фоне 3% водной нагрузки, а контрольная группа – 70 % спирт этиловый в аналогичном объеме. Велось непрерывное наблюдение за животными в первый день, общая длительность эксперимента – 2 недели [10, 71].

2.2.7. Статистическая обработка результатов исследования

Статистическую обработку результатов количественного определения проводили методами вариационной статистики в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» [12]. Оценивали однородность выборок и проводили расчет среднего значения (\bar{X}), стандартного отклонения (S), полуширины доверительного интервала (ΔX) и других основных параметров. Статистическая обработка проводилась с применением программ STATISTICA 8.0 и ChemMetr 1.0 [7].

Валидационную оценку разработанной методики количественного определения проводили по показателям - специфичность, линейность, правильность, в соответствии с требованиями ОФС ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» [12].

Специфичность методики определяли по соответствию максимумов поглощения электронных спектров извлечений травы чернушки посевной и стандартного образца рутина методом дифференциальной УФ-спектроскопии после реакции с комплексообразователем.

Линейность результатов определяли на 4 растворах различной концентрации стандартного образца рутина. По результатам полученных данных построили график в координатах «концентрация рутина, мг/мл – оптическая плотность» и рассчитали уравнение линейной регрессии ($Y = aX + b$), коэффициент детерминации (R^2), стандартное отклонение с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2019.

Правильность методики оценивали путем введения в аликвоту спиртового извлечения из ЛРС навески СО рутина в количестве от 25 % до 75 % от исходного содержания в пробе. Далее рассчитывали систематическую ошибку (δ).

Общий дизайн исследования представлен на рисунке 8.



Рисунок 8 – Дизайн проведения исследования по фармакогностическому изучению чернушки посевной

Решение вопросов стандартизации нового предложенного вида лекарственного растительного сырья «Чернушки посевной трава» также необходимо для обоснования расширения номенклатуры экстракционных препаратов на основе ЛРС.

Таким образом, общий дизайн проведенного исследования (рис. 8) включал как подробное фармакогностическое изучение всего растения – чернушки посевной (*Nigella sativa* L.), так и углубленное изучение первичных (жирное масло) и вторичных метаболитов (соединения фенольной и терпеноидной природы), содержащихся в изучаемом объекте.

ГЛАВА 3. МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ТРАВЫ ЧЕРНУШКИ ПОСЕВНОЙ (*NIGELLA SATIVA* L.)

В литературных источниках отечественными и зарубежными исследователями изложены в основном морфолого-анатомические и гистохимические исследования семян чернушки посевной и дамасской [55, 67, 135, 172]. Коллективом пятигорских авторов проведено морфолого-анатомическое изучение и сравнение семян ч. посевной (*Nigella sativa* L.) и ч. дамасской (*Nigella damascena* L.). Были установлены основные морфолого-анатомические признаки сырья и схожесть строения семян данных видов [55].

В работах зарубежных исследователей присутствует информация по общей морфологии и анатомии отдельных вегетативных органов этих растений – корня и стебля [144, 184]. Однако для установления диагностически значимых признаков вида необходимо проведение более подробного анатомо-гистологического исследования всех морфологических частей травы ч. посевной.

Обзор научной литературы показал, что данных по морфолого-анатомии вегетативных органов растения недостаточно, а исследования по морфолого-анатомии цветка отсутствуют. Не изучены особенности люминесценции органов и тканей растения, которые помогли бы установить наличие и локализацию биологически активных соединений. Также в соответствии с нормативными требованиями раздела «Микроскопические признаки» по ГФ РФ XIV издания для листьев должно быть отражено описание петиолярных особенностей листа, что подразумевает представление морфолого-анатомических признаков черешка. Анатомическое строение листового черешка обычно обусловлено высокой видовой специфичностью данного признака [12, 76].

3.1. Морфолого-анатомическое изучение и выявление диагностически значимых признаков травы чернушки посевной

В соответствии с дизайном исследования и с позиции последующего обоснования перспективности комплексной переработки растения, морфолого-анатомическое изучение было проведено в отношении вегетативной и генеративной части сырья.

3.1.2. Изучение морфологических и анатомических признаков вегетативной части травы чернушки посевной (листья и стебель)

Общий вид надземной части ч. посевной имеет характерные признаки строения представителей семейства Лютиковых (*Ranunculaceae*): высокий прямостоячий ребристый стебель до 30-50 см, перисто-рассеченные листья, на конце стебля достаточно крупный 5-членный цветок (рис. 8).

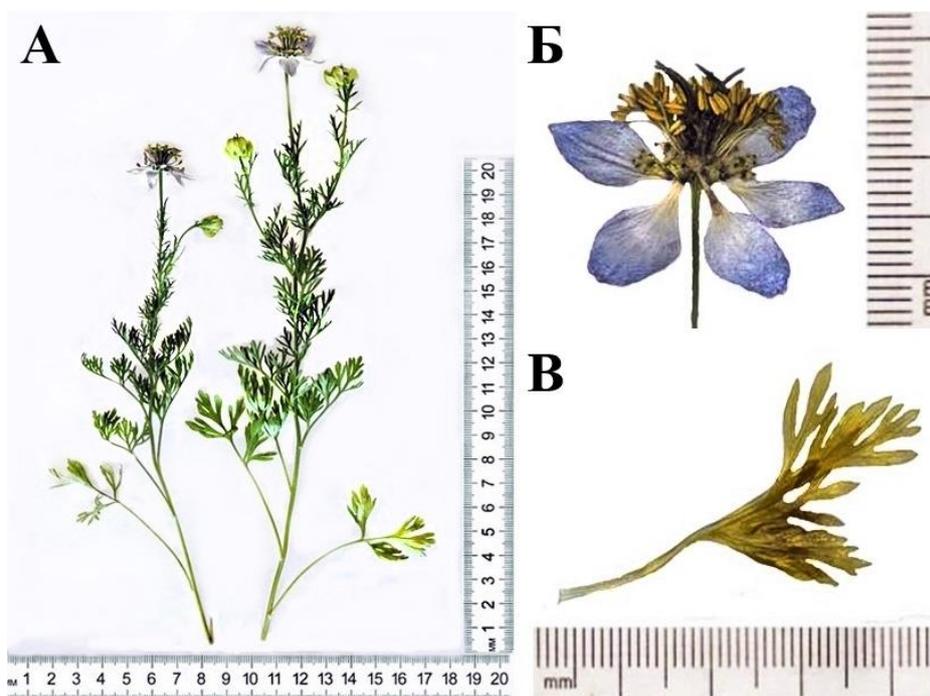


Рисунок 9 – Чернушка посевная: А – общий вид объекта; Б – цветок; В – лист

Поверхность стебля ч. посевной имеет выраженное опушение, представленное двумя типами трихом: каплевидные двухклеточные волоски (рис. 10 А), встречающиеся часто и, реже, одноклеточные длинные (рис. 10 В, Г).

Каплевидные двухклеточные волоски имеют крупную живую клетку в основании с заметным структурированным протопластом. Протопласт в нативном состоянии светло-желтый, при обработке раствором Судана III окрашивается в розовый цвет, что говорит о его липофильности (рис. 10 Б). При облучении трихом УФ-светом с длиной волны 360 нм наблюдается выраженное светло-голубое до белого свечение характерное для ряда фенольных соединений (рис. 10 В). Верхняя конечная клетка – мёртвая, со спавшимися стенками. Протопласт конечной клетки не диагностируется (рис. 10 А).

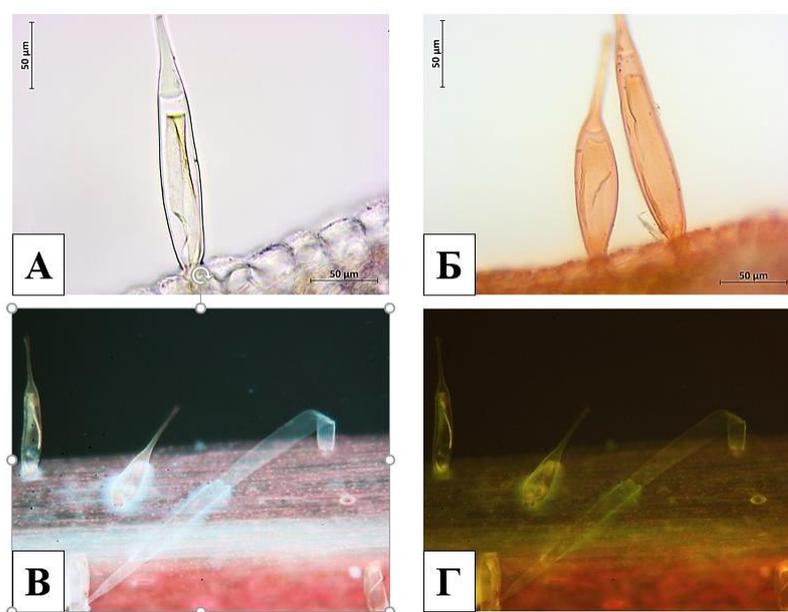


Рисунок 10 – Трихомы стебля чернушки посевной: А – каплевидный волосок в видимом спектре излучения (x400); Б – каплевидный волосок после окраски раствором Судана III (x400); В – люминесценция трихом стебля при $\lambda=360$ нм (x100); Г – люминесценция трихом стебля при $\lambda=420$ (x100).

Эпидермальные клетки стебля – прозенхимные, многоугольные по форме, без видимой извилистости (приложение №1, рис. 1 А, Б). На поверхности эпидермиса достаточно часто встречаются устьица аномоцитного типа, они окружены 4-5 эпидермальными клетками; устьичный аппарат при облучении УФ-светом имеет характерное свечение (приложение №1, рис. 1 Б, В, Г).

Основная паренхима стебля ч. посевной крупноклеточная (рис. 11 А, Б). Стебель переходного типа. Проводящая система стебля представлена

открытыми коллатеральными пучками, расположенными по окружности, чередуясь по размеру. Пучки стебля локализованы по его ребрам (рис. 11 Б, В, Д). Сосуды лигнифицированы, что подтверждено окраской сернокислого анилина (рис. 11 В, Г). Флоэмная часть мелкоклеточная, представлена неодревесневшими паренхимными клетками (рис. 11 В, Г).

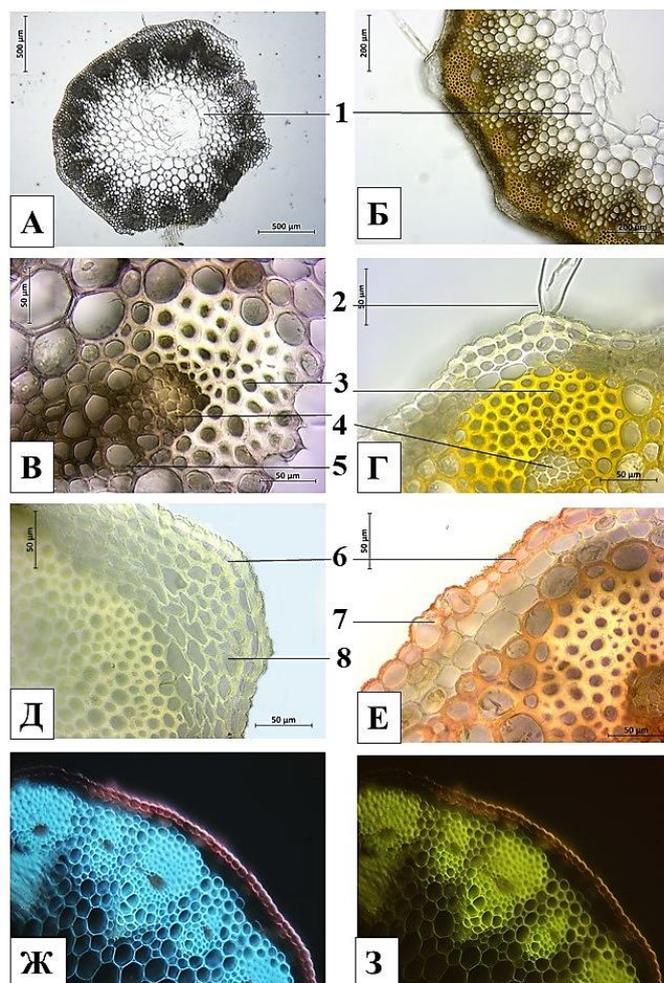


Рисунок 11 – Стебель чернушки посевной (поперечное сечение):

А – общий вид (x40); Б – фрагмент стебля после окраски раствором сернокислого анилина (x100); В – проводящий пучок (x400); Г – фрагмент стебля с проводящим пучком после окраски раствором сернокислого анилина (x400); Д – ребро стебля (x400); Е – фрагмент стебля после окраски раствором Судана III (x400); Ж – люминесценция фрагмента стебля при $\lambda=360$ нм; З – люминесценция фрагмента стебля при $\lambda=420$.

Обозначения: 1 – основная паренхима; 2 – основание каплевидного волоска; 3 – склеренхима; 4 – флоэма; 5 – сосуды ксилемы; 6 – эпидерма; 7 – устьичный аппарат; 8 – уголоковая колленхима

Проводящие элементы пучков имеют характерную люминесценцию при облучении УФ-излучением – ярко-синюю при $\lambda=360$ нм и желтую при $\lambda=420$

нм (рис. 11 Ж, З). Эпидерма стебля кутинизирована, приобретает розовую окраску после окрашивания раствором Судана III. При облучении кутикулы $\lambda=360$ нм наблюдается розовая люминесценция (рис. 11 Е, Ж). На поперечном срезе, под эпидермисом в ребрах стебля ч. посевной наблюдается несколько рядов уголковой колленхимы, которая отсутствует по остальной части окружности (рис. 11 Г, Д).

Очередно расположенные листья в основании стебля черешковые, а ближе к верхушке стебля сидячие или коротко-черешковые. Листовые пластинки дважды-, трижды перисто-рассеченные на узколанцетные сегменты (рис. 9 А, В).

Эпидермальные клетки листа с обеих сторон сильно извилистые, в особенности с нижней стороны, с верхней стороны можно наблюдать четковидные утолщения клеточных стенок. Устьичные аппараты аномоцитного типа - окружены 4-5 клетками и погружены в ткани, преимущественно расположены с нижней стороны листа (рис. 12 Д, Е, рис. 7 А, Б). С поверхности листовой пластинки хорошо видны сосуды центральной и боковых жилок, сходящиеся на конце листа (рис. 12 А, Б, Ж, З).

На поперечном сечении листовой пластинки наблюдается утолщение эпидермиса верхней части листа и общая кутинизация эпидермиса, который окрашивается раствором Судана III в розовый цвет (рис. 12 Б-Г). Лист дорсовентрального типа: палисадная паренхима листа однорядная и расположена с адаксиальной (верхней) стороны листа, губчатая – с абаксиальной (нижней) стороны (рис. 12 В). У листовой пластинки система проведения обозначена закрытыми коллатеральными пучками с достаточно выраженной частью лигнифицированной ксилемы. Флоэмная часть пучка менее выражена и состоит из мелких тонкостенных клеток. В ксилемной части пучка при приближенном рассмотрении наблюдаются отдельные проводящие элементы (рис. 12 Г).

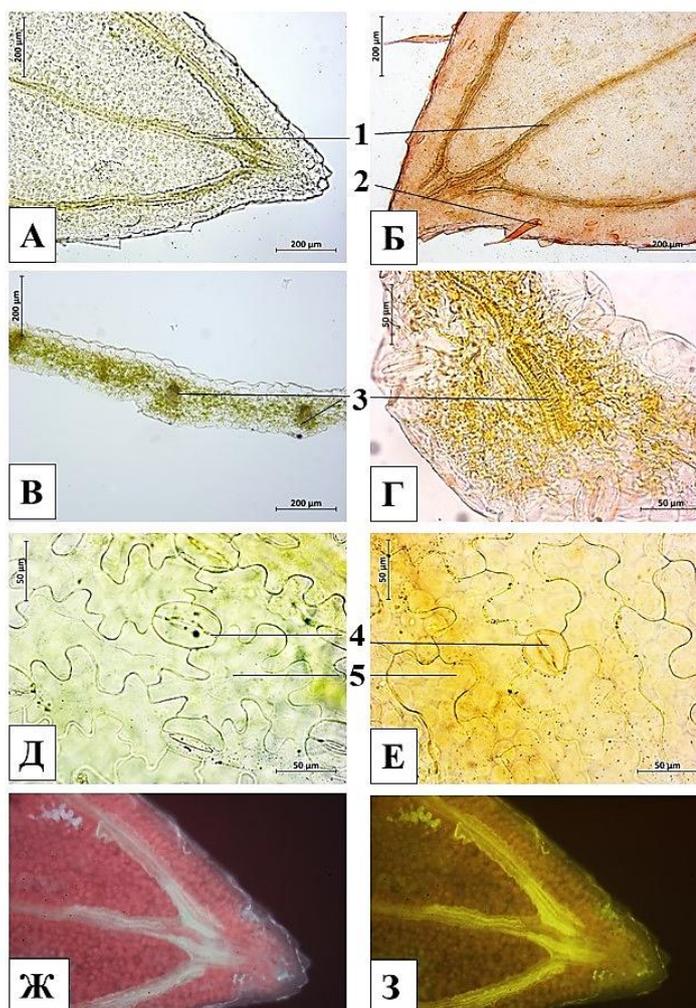


Рисунок 12 – Листовая пластинка чернушки посевной: А – эпидермис верхней стороны (x40); Б – эпидермис нижней стороны, окраска раствором Судана III (x40); В – поперечное сечение (x100); Г – поперечное сечение, окраска раствором Судана III (x400); Д – эпидермис нижней стороны (x400); Е – эпидермис верхней стороны, окраска раствором Судана III (x400); Ж – люминесценция эпидермиса верхней стороны листовой пластинки при $\lambda=360$ нм (x40); З – люминесценция эпидермиса верхней стороны листовой пластинки при $\lambda=420$ нм (x40)

Обозначения: 1 – жилка листа; 2 – каплевидный волосок;
3 – проводящие сосуды; 4 – устьичный аппарат; 5 – эпидермис

Люминесцентная микроскопия листовой пластинки ч. посевной позволила диагностировать яркое свечение проводящих сосудов – голубое свечение при облучении $\lambda=360$ нм, желто-оранжевое при $\lambda=420$ нм (приложение №1, рис. 3 А-Г). Кутикула верхней части листа при $\lambda=360$ нм имеет розовую окраску свечения, а при $\lambda=420$ нм – оранжевую (приложение

№1, рис. 3 А, Б). Устьица, в свою очередь, также имеют люминесценцию (приложение №1, рис. 3 Д, Е).

Листовая пластинка имеет опушение - по краям листовой пластинки и вдоль крупных жилок с нижней стороны листа имеются двухклеточные каплевидные волоски (рис 12. Б, рис. 13 А-Г). Снаружи волоски покрыты гладкой кутикулой, окрашивающейся раствором Судана III в розовый цвет (рис. 13 Б). Протопласты каплевидных волосков люминесцируют при облучении УФ-светом при $\lambda=360$ нм и 420 нм – отмечается голубая и желто-оранжевая люминесценция, соответственно (рис. 13 В, Г).

При ближайшем рассмотрении края листовой пластинки (x400) диагностируются мелкие зубцы, которые не видны невооруженным глазом (рис.13 Д, Е).

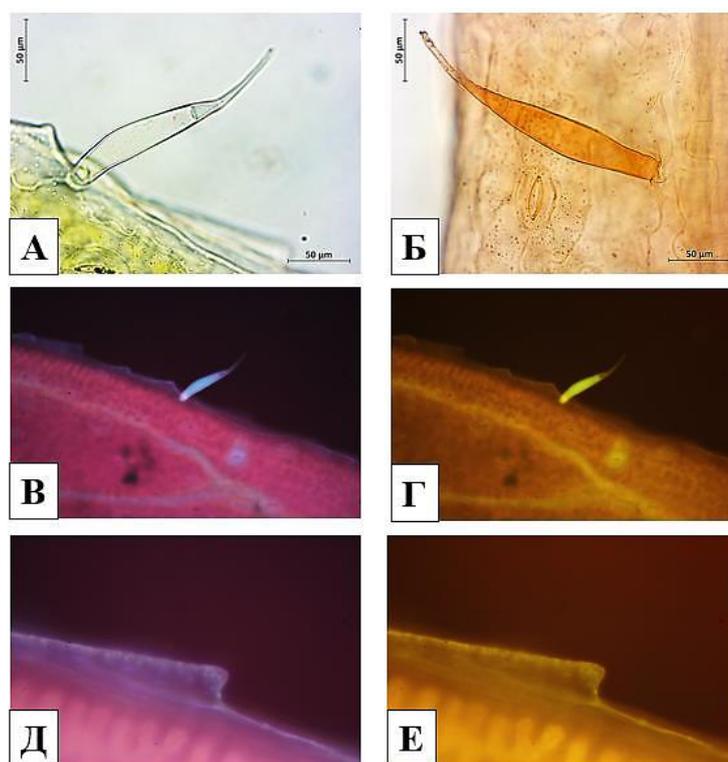


Рисунок 13 – Край листовой пластины чернушки посевной: А – волосок при дневном свете (x400); Б – волосок, окраска раствором Судана III (x400); В – волосок при $\lambda=360$ нм (x100); Г – волосок при $\lambda=420$ нм (x100); Д – край листа при $\lambda=360$ нм (x400); Е – край листа при $\lambda=420$ нм (x400)

Черешок листа ч. посевной в медиальной части на поперечном срезе неправильной U-образной формы и вдавлен с адаксиальной стороны, а ребра

имеют округлую форму и направлены к верхней стороне листа (рис 14. А). Имеется характерное опушение черешка – превалирует количество каплевидных волосков, однако главной особенностью является расположение на концах ребер черешка длинных простых волосков (рис. 14 Д, Е). Трихомы и кутикула внешней оболочки клеток черешка под действием раствора Судана III имеют характерное красное окрашивание (рис. 14 Б).

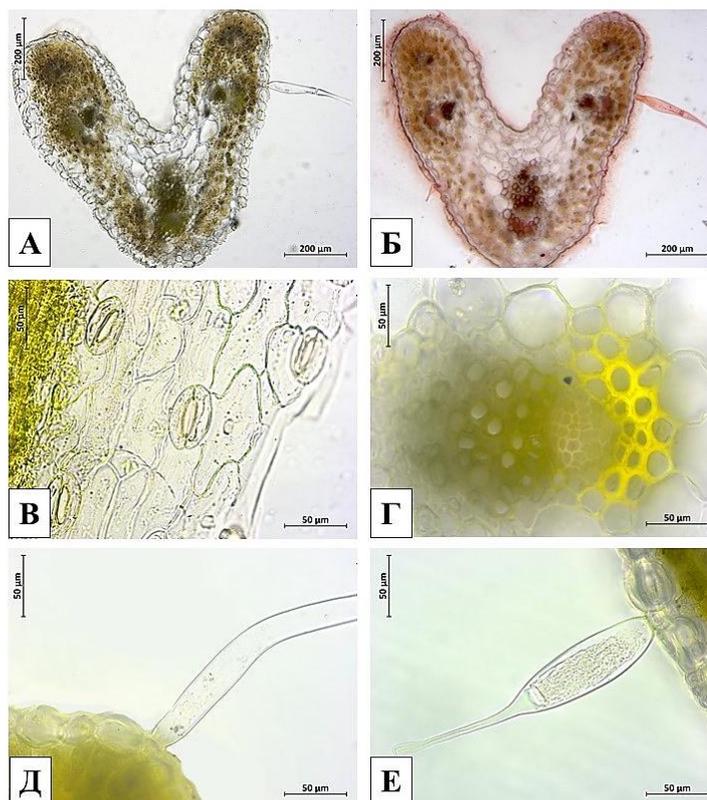


Рисунок 14 – Черешок листа чернушки посевной: А – общий вид (x100); Б – общий вид, окраска раствором Судана III (x100); В – эпидермис с устьицами (x400); Г – центральный проводящий пучок после окраски раствором сернокислого анилина (x400); Д – длинный простой волосок (x400); Е – каплевидный волосок (x400)

Эпидермальные клетки черешка слабоизвилистые очертания, устьичный аппарат - аномоцитный (4-5 клеток) (рис. 14 В). Проводящая система черешка представлена системой проводящих пучков в числе пяти. Пучок центральной жилки – крупнее остальных. Он закрытого коллатерального типа, расположен ближе к абаксиальной стороне черешка, также с небольшим промежутком друг от друга в сторону ребер располагаются небольшие пучки аналогичного

строения (рис 14 А, Б, Г). Все пучки армированы и имеют характерную желтую окраску после обработки раствором сернокислого анилина (рис. 14 Г).

Люминесценция лигнифицированных клеток ксилемы и склеренхимы флоэмной части при облучении 360 нм – светло-голубая, при 420 нм – ярко-желтая. Проводящие элементы флоэмы и паренхимные клетки ксилемы люминесцируют бурым цветом при облучении 360 нм, при 420 нм – светло-розовым (приложение №1, рис. 2).

3.1.2. Изучение морфологических и анатомических признаков генеративной части травы чернушки посевной (цветки)

Ч. посевная имеет крупные, одиночные, актиноморфные, обоеполые, верхушечные цветки (рис. 15 А, Б). Цветок имеет венчиковидную чашечку из 5 окрашенных, белых у основания и синими на конце лепестковидных продолговатых чашелистиков – на вершине притупленных, к основанию суженных в короткую ножку, околоцветник простой (рис. 15). Лепестков в числе 5-8, представленных двугубыми мясистыми нектарниками сложной формы: верхняя губа имеет разделение на 2 равные части; нижняя губа – полая, роговидного вида, снабжена нектароносной ямкой (рис 15 В). Тычинки многочисленные, плодолистики (пестики) в числе 3-5 штук (рис. 15 Б).

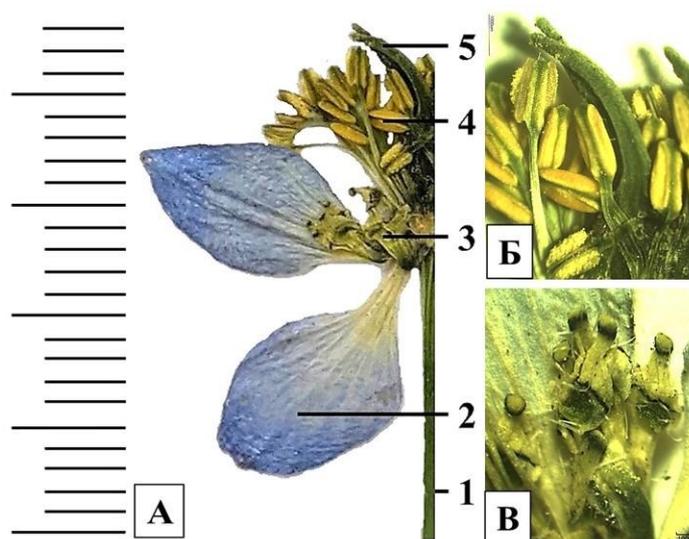


Рисунок 15 – Цветок чернушки посевной: А – Общее строение цветка;
 Б – репродуктивные органы (x20); В – лепестки-нектарники (x40)
 Обозначения: 1 – цветоножка, 2 – чашелистик, 3 – лепестки-нектарники;
 4 – тычинка; 5 – пестик

Чашелистики чашечки цветка ч. посевной имеют выраженную проводящую систему с центральной и отходящими от нее жилками (рис. 16 А). Наблюдается кутинизация эпидермиса и опушение по краям и крупным жилкам листа; 2 типа волосков – в основном каплевидные и длинные простые волоски, которые окрашиваются раствором Судана III (рис. 16 Б). Клетки эпидермиса нижней части чашелистиков извилистые, с большим количеством устьиц аномоцитного типа (4-5 клеток) (рис. 16 Г). Верхний эпидермис представлен утолщёнными клетками, к сужению листа - клетки эпидермиса становятся более ровными и вытянутыми, почти прямоугольной формы (рис. 16 В).

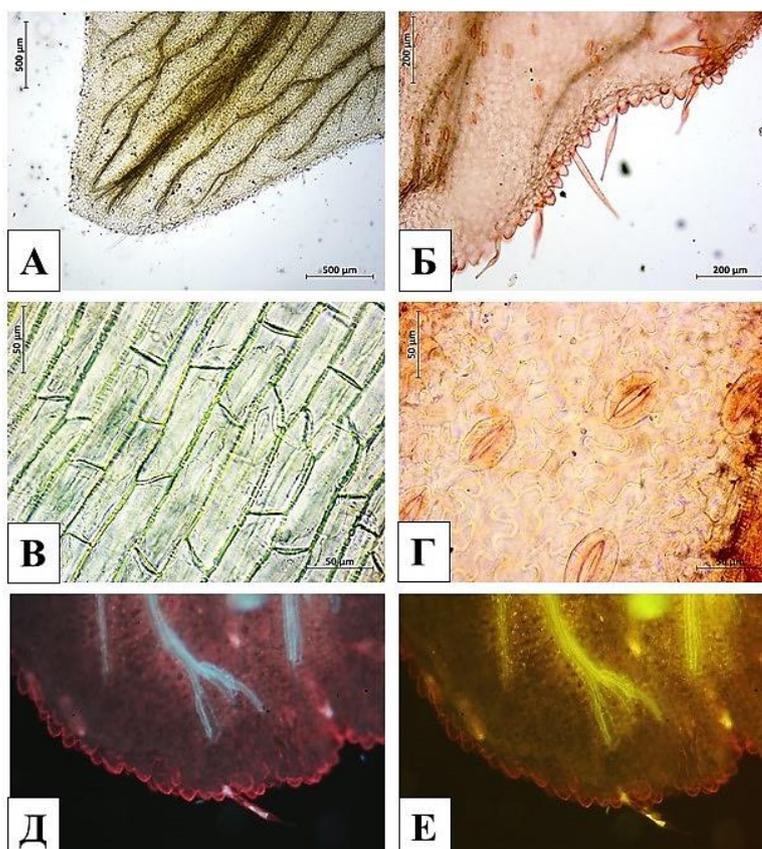


Рисунок 16 – Чашелистик чернушки посевной: А – эпидермис верхней стороны (x40); Б – край, окраска раствором Судана III (x100); В – эпидермис основания (сужение) (x400); Г – эпидермис нижней стороны, окраска раствором Судана III (x400); Д – люминесценция фрагмента при $\lambda=360$ нм (x100); Е – люминесценция фрагмента при $\lambda=420$ нм (x100)

Люминесцентная микроскопия чашелистиков ч. посевной при облучении $\lambda=360$ нм и $\lambda=420$ нм показала характерную яркую люминесценцию

проводящих сосудов, кутикулы и волосков, аналогично описанной выше для листовой пластинки ч. посевной (рис. 16 Д, Е).

Нектарники сложной формы, диагностически значимая часть – это строение верхней губы, в том числе её густое опушение длинными волосками, покрытыми толстой гладкой кутикулой, окрашиваемой в яркий красный цвет после обработки микропрепарата раствором Судана III (рис. 17 А, Б). Клетки эпидермиса утолщены, имеют характерную извилистость (рис. 17 Д). Имеется нектароносная ямка, клетки которой имеют яркий желтый цвет, а кончик губы также имеет темно-желтую окраску (рис. 17 В, Г, Е).

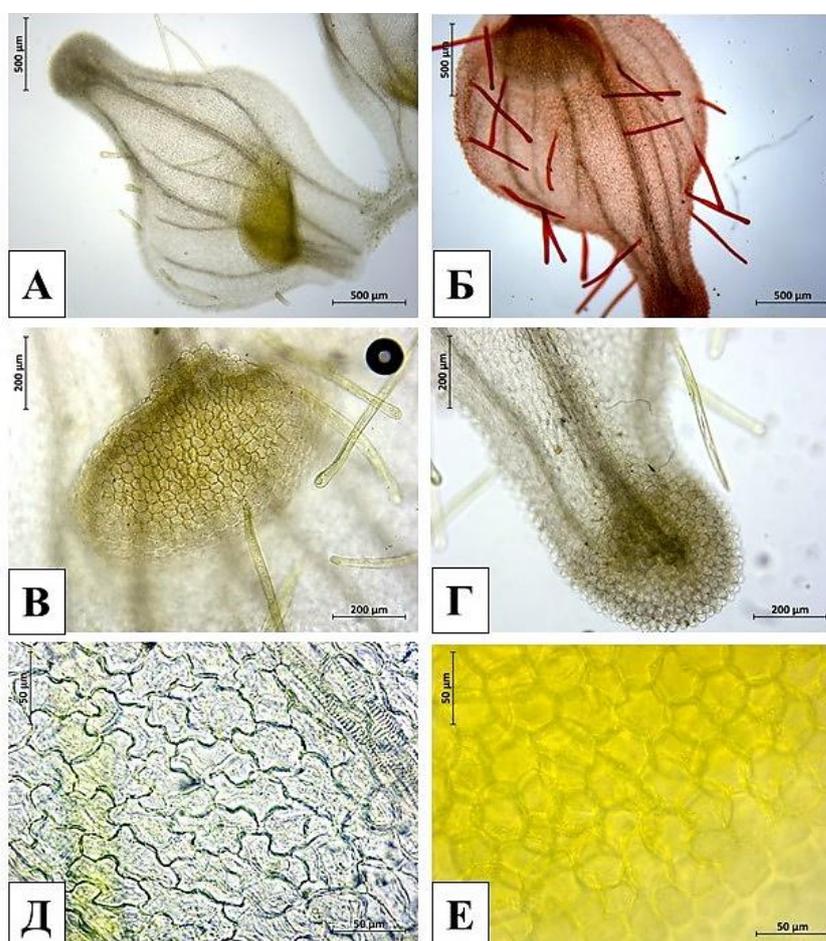


Рисунок 17 – Строение верхней губы нектарника чернушки посевной: А – фрагмент верхней губы (x40); Б – фрагмент верхней губы, окраска раствором Судана III (x40); В – нектароносная ямка (x100); Г – кончик верхней губы (x100); Д – эпидермис (x400); Е – клетки нектароносной ямки (x400)

Нижняя губа нектарника имеет овалообразное тело основания с длинным кончиком, нектароносных клеток не наблюдается (рис. 18 А, Б). Тело

нижней губы имеет небольшие сосочковидные трихомы по поверхности, кутикула которых также окрашивается раствором Судана III (рис. 18 В, Г).

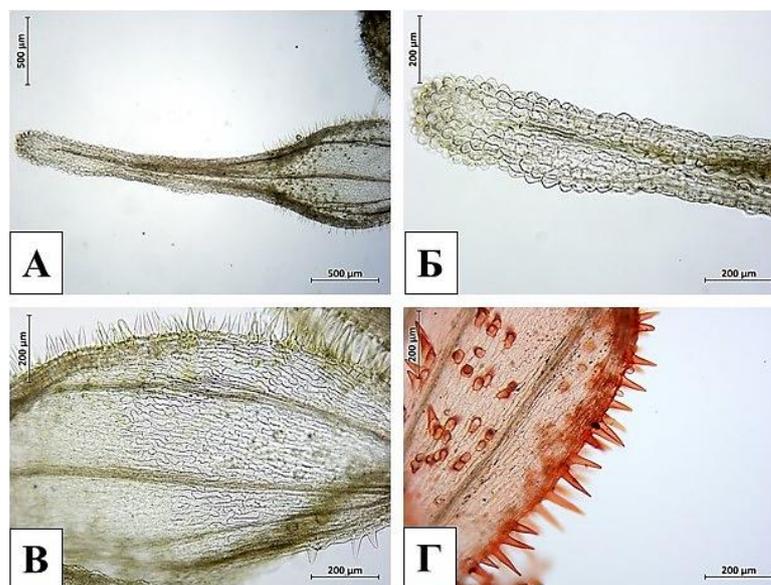


Рисунок 18 – Строение нижней губы нектарника чернушки посевной: А – фрагмент нижней губы (x40); Б – кончик нижней губы (x100); В – фрагмент тела (x100); Г – фрагмент тела, окраска раствором Судана III (x40);

Люминесцентная микроскопия верхней губы выявила яркое розовое свечение длинных трихом при $\lambda=360$ нм и красного цвета – при $\lambda=420$ нм (приложение №1, рис. 4 А-Г). Нектароносная ямка и кончик верхней губы имеют схожую светимость при воздействии УФ-света: при $\lambda=360$ нм – голубое свечение по центру клеток и яркий розовый оттенок внешней оболочки кутикулы, при $\lambda=420$ нм – темно-оранжевого цвета с красно-оранжевым очертанием (приложение №1, рис. 4 Д-З).

Сосочкообразные трихомы нижней губы нектарника также имеют характерную люминесценцию: при $\lambda=360$ нм - розового цвета, при $\lambda=420$ нм – красного (приложение №1, рис. 5 А, Б, Д, Е). Эпидермис губы кутинизирован: розовая и красная окраска при $\lambda=360$ и 420 нм, соответственно. На кончике губы можно наблюдать голубую люминесценцию сосудов при $\lambda=360$ нм (приложение №1, рис. 5 В, Г).

Также была проведена люминесцентная микроскопия основания соединения верхней и нижней губы (рис. 19). Отмечается яркая

люминесценция содержимого клеток у нижней части основания – ярко розового при $\lambda=360$ нм и темно-оранжевого цвета при $\lambda=420$ нм (рис. 19 Б-Д).

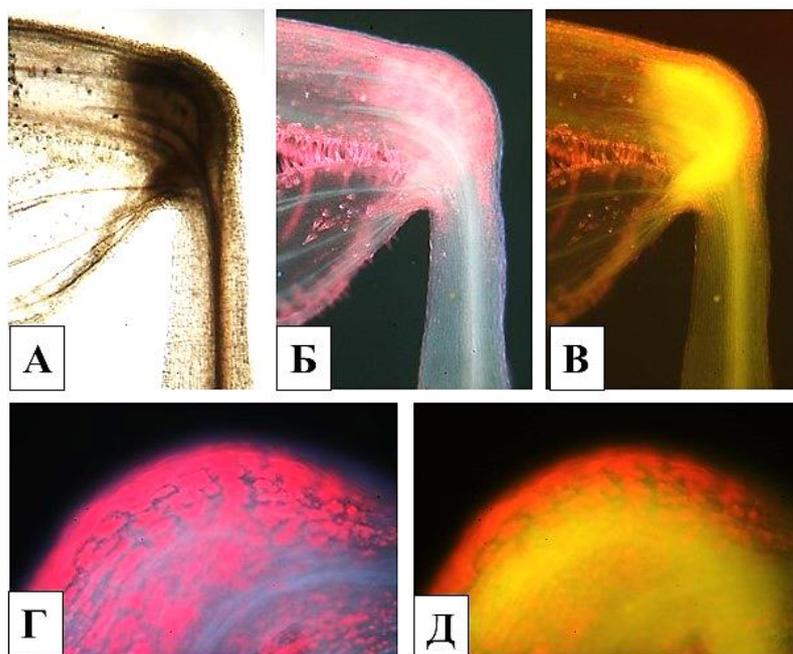


Рисунок 19 – Люминесценция основания лепестка-нектарника чернушки посевной: А – фрагмент основания при дневном свете (x40); Б – фрагмент основания при $\lambda=360$ нм (x40); В – фрагмент основания при $\lambda=420$ нм (x40); Г – фрагмент основания при $\lambda=360$ нм (x100); Д – фрагмент основания при $\lambda=420$ нм (x100)

Андроцей ч. посевной представлен множеством свободных тычинок - многобратственный. Тычинки с хорошо заметными пыльниками с достаточно длинными тычиночными нитями, располагающимися открыто на цветоложе над лепестковидными чашелистиками (рис. 15 А, Б). Пыльники имеют овальную форму, пыльцевые зерна многочисленны и имеют округлую форму размером около 50 мкм (рис. 20 А, Б, Д). Эпидермис пыльников имеет тонкую оболочку - окрашивается раствором Судана III, как и пыльцевые зерна (рис. 20 В). После обработки микропрепарата раствором сернокислого анилина наблюдается окрашивание пыльцевых клеток внутри пыльника, что говорит о лигнификации их оболочек (рис. 20 Б, Г). Эпидермальные клетки тычиночной нити прямые, трихомы отсутствуют (рис. 20 Е).

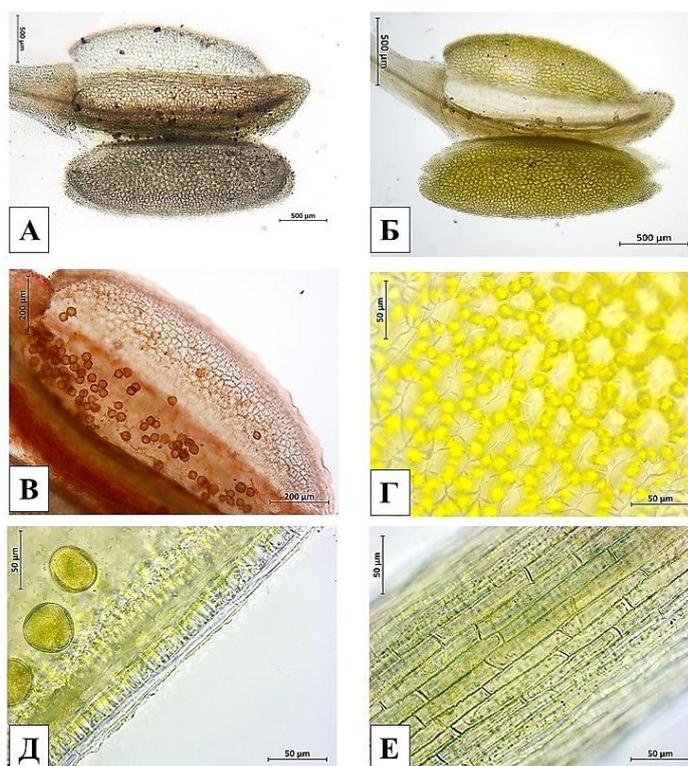


Рисунок 20 – Строение тычинки и тычиночной нити чернушки посевной: А – пыльник при дневном свете (x40); Б – пыльник после окраски раствором сернокислого анилина (x40); В – фрагмент пыльника, окраска раствором Судана III (x100); Г – фрагмент центральных клеток пыльника после окраски раствором сернокислого анилин (x400); Д – фрагмент внешней части пыльника с пыльцевыми зернами (x400); Е – эпидермис тычиночной нити (x400)

Люминесцентный микроскопический анализ тычинок выявил характерное свечение для связников и центральных клеток пыльников (приложение №1, рис. 6).

Гинецей цветка ч. посевной гемисинкарпный – представлен 5 сросшимися плодолистиками. Завязь верхняя, в процессе созревания формирует плод – коробочку из 5 вздутых сросшихся зернисто-бугристых листовок (рис. 21 А). Пестики располагаются в цветке аналогично тычинкам – открыто на цветоножке над лепестковидными чашелистиками (рис. 15 А, Б). Рыльца пестика цельное, однолопастное (рис. 21 Б). Поверхность завязи имеет опушение двумя типами трихом: многоклеточные округлые железки, которые и являются теми бугристыми образованиями на завязи; второй тип – каплевидные простые волоски аналогично трихомам на других органах (рис.

21 В-Д). Трихомы имеют характерную темно-красную оболочку после обработки раствором Судана III (рис. 21 Г, Е). Под трихомами наблюдается слой клеток, имеющий особую гранулярную структуру протопласта, нативно – зелёного цвета. Вероятнее всего, что гранулярность протопласта обусловлена более крупными хлоропластами, которые при обработке раствором Судана III окрашиваются в розовый цвет (рис. 21 Е).

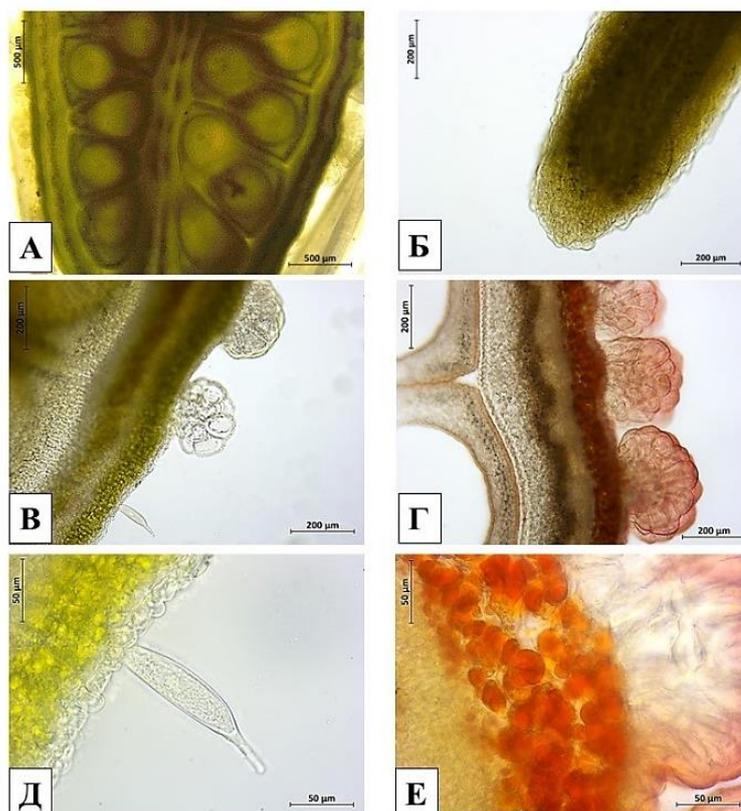


Рисунок 21 – Строение пестика чернушки посевной (x40): А – фрагмент завязи (40x); Б – кончик пестика (40x); В – трихомы завязи (100x) Г – трихомы завязи, окраска раствором Судана III (x100); Д – каплевидный волосок (x400); Е – гранулярный протопласт, окраска раствором Судана III (x400)

Люминесцентная микроскопия пестика ч. посевной выявила характерное видимое свечение для слоя клеток с гранулярным протопластом в верхнем эпидермисе: яркое розовое при $\lambda=360$ нм, ярко красное при $\lambda=420$ нм, чуть менее выражено свечение оболочек трихом (рис. 22 А, Б). Характер люминесценции проявляется в основном за счёт хлорофилла протопластов.

Также характерную люминесценцию имеют клетки проводящей системы в центре завязи пестика (рис. 22 В, Г).

Цветоножка цветка ребристая, покрыта трихомами - является продолжением стебля и имеет аналогичное строение со стеблем (рис. 11, рис. 15 А).

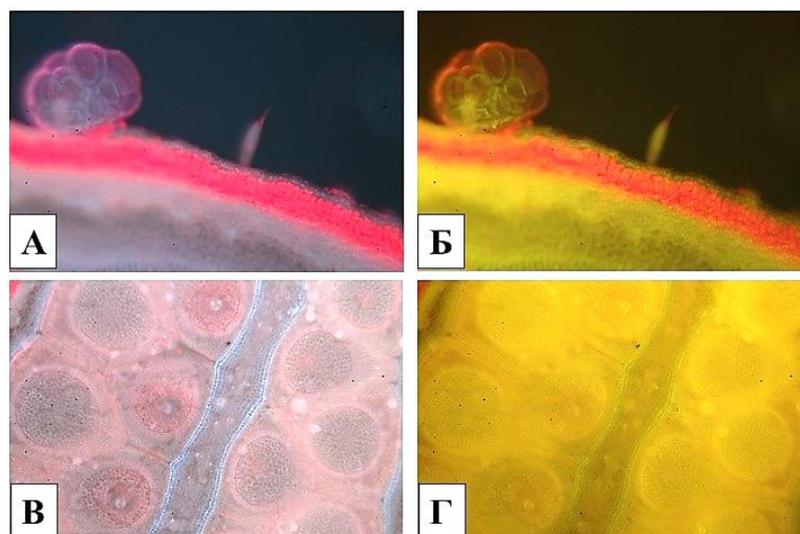


Рисунок 22 – Люминесценция пестика чернушки посевной: А – трихомы при $\lambda=360$ нм (x100); Б – трихомы при $\lambda=420$ нм (x100); В – фрагмент завязи со связником при $\lambda=360$ нм (x100); Г – фрагмент завязи со связником при $\lambda=420$ нм (x100)

3.2. Люминесцентное микроскопическое детектирование диагностически значимых биологически активных соединений в траве чернушки посевной

Помимо подробного морфолого-анатомического и гистохимического анализа надземных органов растения, методом люминесцентной микроскопии изучались особенности свечения очищенных веществ, обнаруженных в траве ч. посевной. Данный метод позволяет проводить диагностику с описанием локализации БАС в тканях и органах растений [12, 35]. Для этого нами были получены микрофотографии люминесценции выделенных и идентифицированных веществ, СО при $\lambda=360$ нм и $\lambda=420$ нм (рис. 23).

Анализ люминесценции выделенных флавоноидов из травы ч. посевной выявил некоторые закономерности в особенностях свечения гликозидных производных флавонолов – рутина (3-О- β -D-глюкопиранозид кверцетина), никотифлорина (3-О- β -D-глюкопиранозид кемпферола), нигелфлавонозида G

(3-O- β -D-[α -L-O-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 6)]-глюкопиранозид-[(2 \rightarrow 1)-O- β -D-глюкопиранозил-(2 \rightarrow 1)-O- β -D-глюкопиранозил]-3,5,6,7,4'-пентагидрокси-3'-метоксифлавона). Отмечается характерная схожесть свечения кристаллов при $\lambda=420$ нм – желто-зеленое свечение; наиболее специфичные особенности свечения отмечаются при $\lambda=360$ нм: для рутина – более выраженные светло-оранжевые оттенки, для никотифлорина – бело-голубого цвета, для нигелфлавонозида G – голубая люминесценция (рис. 23 А-В).

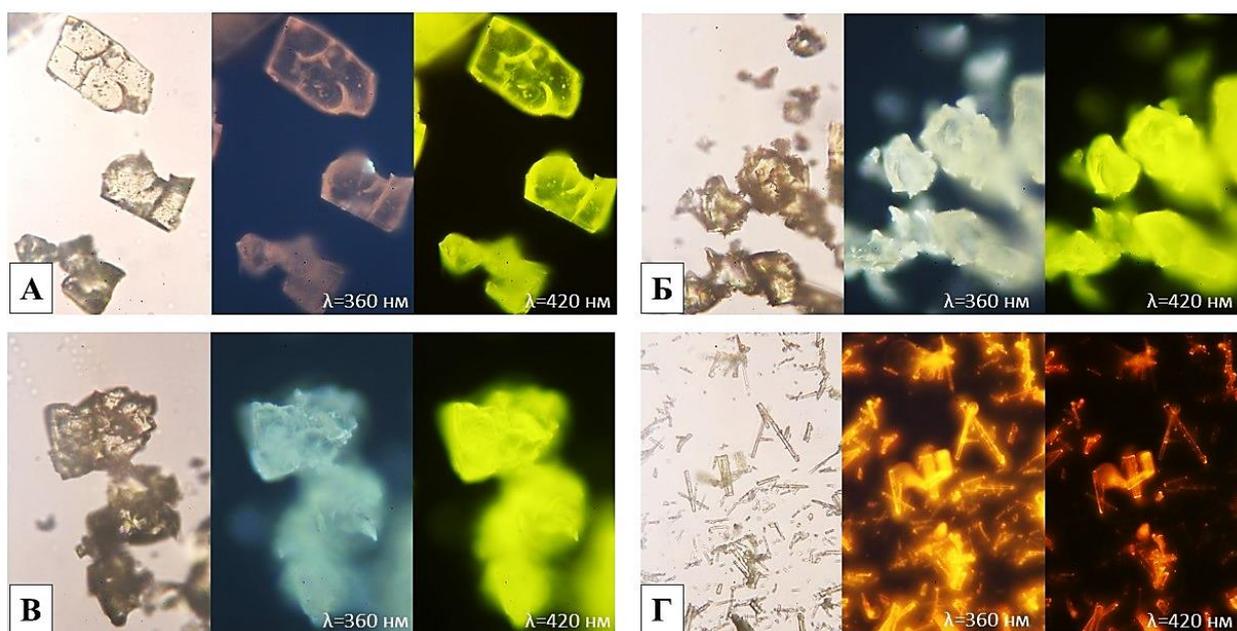


Рисунок 23 – Кристаллы выделенных и стандартных образцов флавоноидов в видимом свете, при облучении $\lambda=360$ нм и $\lambda=420$ нм: А – рутин; Б – никотифлорин; В – нигелфлавонозид G; Г – СО кверцетина

Однако при сравнении 3-O-рутинозида кверцетина (рутина) с исходной формой флавонола – кверцетина, замечено уменьшение силы свечения и её цвета: для СО кверцетина при $\lambda=360$ нм – ярко-желтое свечение, а при $\lambda=420$ нм – темно-оранжевое (рис. 23 Г).

На дальнейшем этапе изучения нами оценивалась возможная локализации данных БАВ в тканях травы ч. посевной. Выделенные соединения, имеющие при $\lambda=360$ нм голубое свечение и при $\lambda=420$ нм – желтое, могут быть локализованы в диагностически специфичных трихомах – каплевидных и длинных простых волосках, которыми покрыты основные надземные органы ч. посевной, а также в основной паренхиме стебля, с

похожим голубым свечением при $\lambda=360$ нм и с желтым при $\lambda=420$ нм (рис. 13, 16; приложение №1, рис 2). Не менее специфичные трихомы цветка имеют, вероятнее всего, другое содержание БАВ (рис. 22; приложение №1, рис. 4, 5).

При микроскопировании проводящей системы различных органов за счет лигнификации оболочек клеток ксилемы и склеренхимы отмечается ярко-голубая люминесценция при $\lambda=360$ нм и темно-желтая при $\lambda=420$ нм (рис. 11-12, 16, 22; приложение №1, рис. 2, 3).

Также в процессе изучения препаратов основных вегетативных органов отмечается люминесценция розового цвета при $\lambda=360$ нм оболочек стебля, листа, черешка и некоторых частей цветка, что обусловлено наличием каротиноидных структур и кутина (рис. 11, 16; приложение №1, рис. 2, 3). Кроме того, яркую красно-розовую люминесценцию клеток в органах цветка (нектарниках, тычинках и завязи) можно объяснить возможным содержанием других каротиноидных структур и хлорофилла (рис. 19, 22; приложение №1, рис. 6).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. В результате морфолого-анатомического исследования впервые были изучены и описаны анатомо-гистологические особенности строения цветков ч. посевной.
2. В качестве наиболее диагностически значимых особенностей строения вегетативной части побега (стебель, лист) ч. посевной нами выделены: каплевидные двухклеточные волоски; мелкие зубцы на краю листа, диагностируемые только на большом (x400) увеличении; U-образная форма медиальной части черешка на поперечном сечении и характерной особенностью его опушения – наличием длинных простых волосков на концах ребер.
3. В качестве наиболее диагностически значимых особенностей строения генеративных частей побега (цветок) ч. посевной нами выделены: густое опушение верхней губы нектарника длинными волосками, покрытыми толстой гладкой кутикулой; нижняя губа нектарника, имеющая овалообразное тело основания с длинным кончиком; сосочковидные трихомы по поверхности тела нижней губы; опушение поверхности завязи в виде 2 типов трихом: многоклеточные округлые железки, второй тип – каплевидные простые волоски аналогично трихомам на других органах; наличие под эпидермисом завязи слоя клеток, имеющего особую гранулярную структуру протопласта, нативно – зелёного цвета.
4. Проанализирована особенность люминесценции тканей вегетативных и генеративных органов ч. посевной. Выявленные особенности, характеризующие присутствие в ряде клеток соединений каротиноидной и фенольной природы, являются специфичными для анализируемого объекта и могут быть использованы в диагностике сырья.

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ТРАВЫ ЧЕРНУШКИ ПОСЕВНОЙ (*NIGELLA SATIVA* L.)

Анализ литературы показал, что количество работ по изучению химического состава травы чернушки посевной весьма скромное, особенно по сравнению с работами по семенам и маслу чернушки посевной и что большинство данных исследований было выполнено зарубежными учеными [97, 98, 113, 165, 167].

В части исследований при проведении общего фитохимического скрининга надземных частей травы ч. посевной описаны сапонины, фенольные соединения (флавоноиды и др.), терпеноиды, стероиды, дубильные вещества, жирные кислоты и сердечные гликозиды [97, 98]. В другом исследовании методом ВЭЖХ из метанольных экстрактов было описано 14 соединений – 8 фенольных кислот и 6 флавоноидов (катехин, апигенин, кверцетин и другие), однако доминирующими компонентами были указаны ванилиновая и галловые кислоты [113]. Был также проведен анализ с применением ЯМР- спектроскопии и масс-спектрометрии, где установлено 15 соединений – в основном флавоноидной и тритерпеноидной природы, описан новый тритерпеноидный сапониновый гликозид [165]. Учитывая тот факт, что информация по химическому составу противоречива и ограничена, то дальнейшее изучение фитохимического состава ч. посевной как возможного и перспективного отечественного источника ЛРП является актуальным.

4.1. Выделение из травы чернушки посевной индивидуальных веществ

Выделение основных БАС из травы ч. посевной проводили методом препаративной хроматографии с использованием хроматографических колонок и соответствующих сорбентов (см. раздел 2.2.3. *Хроматографические методы анализа*).

Основные этапы пробоподготовки проведения хроматографического разделения представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Пробоподготовка при проведении колоночной хроматографии сырья травы чернушки посевной

Основные этапы пробоподготовки	Содержание этапа
<i>Подготовка исходного сырья</i>	Траву ч. посевной, заготовленную в июле-августе 2021 г. на территории Ульяновской области, измельчили до размера частиц 2-3 мм, отвесили 190 г. сырья (навеска).
<i>Получение извлечения</i>	Методом дробной мацерации с термическим окончанием в соотношении «сырьё-экстрагент» 1:5 на 70% спирте этиловом было получено извлечение травы ч. посевной объёмом около 1000 мл.
<i>Упаривание извлечения</i>	На ротационном испарителе <i>Labtex ИР-1 ЛТ</i> извлечение было упарено до примерного объёма в 50 мл.
<i>Нанесение извлечения на сорбент</i>	Упаренное извлечение смешивали с силикагелем (L 40/100 КСК) до однородного состояния (примерно 30-40% от массы навески), затем высушили в естественных условиях.
<i>Подготовка хроматографической колонки</i>	В хроматографическую колонку (объёмом 1 л) внесли чистый силикагель (в количестве равном силикагелю с нанесенным извлечением), путем формирования слоя сорбента в хлороформе. Внесли силикагель с нанесенным извлечением. Приступили к хроматографированию.

Последующее элюирование проводилось в градиентном режиме - от чистого хлороформа до 96% спирта этилового, затем водой очищенной. В качестве подвижных фаз использовались хлороформ и спирт этиловый в различных соотношениях (табл. 9). Средний объём элюатов составлял около 150-200 мл. Полученные фракции концентрировали в объёме до 5-10 мл с помощью ротационного испарителя. Последовательность элюирования представлена в таблице 9.

Таблица 9 – Последовательность элюирования БАС из экстракта травы чернушки посевной и получения фракций

Состав элюента, об. %		Объём элюента, мл	Номера фракций
Хлороформ, %	Спирт этиловый, %		
100	0	1000	1-6
97	3	500	7-10
95	5	1000	11-17
93	7	1000	18-24
90	10	1000	25-31
85	15	1500	32-38
80	20	1500	39-47
70	30	1000	48-56
60	40	1300	57-65
50	50	500	66-70
45	55	500	71-73
0	96	1000	74-80
Вода очищенная		500	81-82

Во время проведения элюирования и получения фракций контролировали процесс визуально (по смене окраски растворов и её интенсивности). Параллельно оценивали состав фракций методом ТСХ с использованием внутреннего стандарта – исходного извлечения (настойки) травы ч. посевной. Фракции, имеющие кристаллические включения, подвергали перекристаллизации из различных растворителей. Также использовалась рехроматография на полиамиде и силикагеле.

4.2. Изучение выделенных из травы чернушки посевной индивидуальных веществ

Проводили идентификацию веществ, изолированных из извлечения травы ч. посевной. Соответственно нами были выбраны наиболее значимые и перспективные фракции:

1. Фракции 55-58 [*никотифлорин*] (1). Данные фракции объединили, далее проводили микроколоночную хроматографию на полиамиде (градиентное элюирование хлороформом и этанолом в различных соотношениях). Были получены фракции 96-98 (нумерация продолжена после основной хроматографической колонки), которые были объединены в одну фракцию - вещество жёлтого цвета. Данные фракции были получены при использовании элюентов – хлороформ : этанол в соотношении 60:40.

2. Фракции 59-64 [*нигелфлавонозид G*] (2). Фракции объединяли и провели микроколоночную хроматографию на полиамиде. Последующие фракции были получены при использовании элюента – хлороформ : этанол в соотношении 80:20 и переходе на 60:40. Наблюдалось выпадение тёмно-жёлтого осадка при перекристаллизации смесью вода - ацетон.

3. Фракции 59-64 [*рутин*] (3). Также после описанной выше микроколоночной хроматографии на полиамиде фракций 59-64 при перекристаллизации смесью вода - ацетон были получены кристаллические желтые осадки во фракциях, содержащих рутин (хлороформ : этанол в соотношении 60:40). Маточные растворы очищали микроколоночной хроматографией на сефадексе LH-20 с элюентом – хлороформ : этанол. При использовании элюента, представляющего смесь хлороформа и этанола в соотношении 70:30. При этом было получено вещество в виде осадка зеленовато-желтого цвета.

4. Фракция 7 (основная хроматографическая колонка) [*даукостерин*] (4). Данная фракция очищалась ацетоном, спиртом этиловым 96%. В результате был получен белый кристаллический осадок.

5. Фракции 2-3 (основная хроматографическая колонка) [*β-ситостерин*] (5). Аналогично вышеупомянутому способу проводили очистку фракций. После объединения фракций был получен белый кристаллический осадок.

Далее нами был проведен кислотный гидролиз предполагаемых флавоноидных гликозидов **1-3** для изучения их агликонов. Гидролиз

осуществляли в присутствии 2 % хлористоводородной кислоты на кипящей водяной бане не менее 2 часов.

Был отмечен сдвиг хроматографических зон для веществ **1** и **2** – с $Rf_1=0,48$ и $Rf_2=0,32$ до $Rf_1=0,83$ и $Rf_2=0,88$; для вещества **3** - $Rf_3=0,43$ (рис. 24).

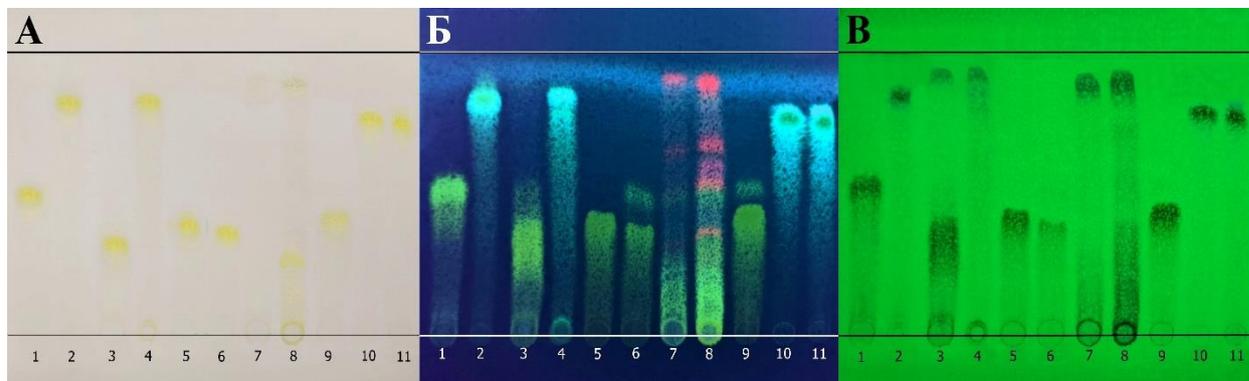


Рисунок 24 – Хроматограммы исследуемых фракций в системе растворителей хлороформ: этанол: вода (25:18:2). А – при дневном свете; Б – в УФ-свете $\lambda=365$ нм (после обработки спиртовым раствором $AlCl_3$); В – в УФ-свете при $\lambda=254$ нм.

Обозначения: 1, 3, 5, 6 – вещества никотифлорин, нигелфлавонозид G и рутин (2 фракции) до кислотного гидролиза, соответственно; 2, 4 – вещества никотифлорин и нигелфлавонозид G после проведения кислотного гидролиза, соответственно; 7 - извлечение из травы ч. посевной (70% спирт этиловый); 8 - настойка травы ч. посевной; 9 –СО рутина; 10 – СО кемпферола; 11 – СО кверцетина

Ферментативный гидролиз флавоноидов **1-3**, который осуществлялся в водном растворе β -глюкозидазы («Sigma») с контролем температуры около 36 °С в течение 24 ч, не дал результатов, что подтверждает сложную структуру гликозидной части флавоноидов.

4.3. Установление химической структуры выделенных веществ

Идентификацию выделенных соединений проводили по данным УФ-, 1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии, а также по результатам кислотного и ферментативного гидролиза. Спектры ЯМР 1H и ЯМР ^{13}C получали на приборе «JNM-ECX 400» в частотах: 399.78 МГц – для ЯМР 1H , 100.52 МГц – для ЯМР ^{13}C .

С помощью прибора Bruker micrOTOF II методом электрораспылительной ионизации (ESI) были получены масс-спектры

высокого разрешения. Анализ спектров поглощения проводили с помощью спектрофотометра «Spectord 40» в диапазоне длин волн 190-500 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

1. Никотифлорин (3-О-β-D-гликопиранозид кемпферола). Кристаллы светло-желтого цвета, состава $C_{27}H_{30}O_{15}$, с т.пл. 182-186° (водный спирт). λ_{max} EtOH 269, 355 нм; +NaOAc 272, 304, 365; +AlCl₃, 274, 304, 345, 394; +AlCl₃+HCl 275, 304, 345, 394; + NaOMe 275, 326, 400 (рис. 25).

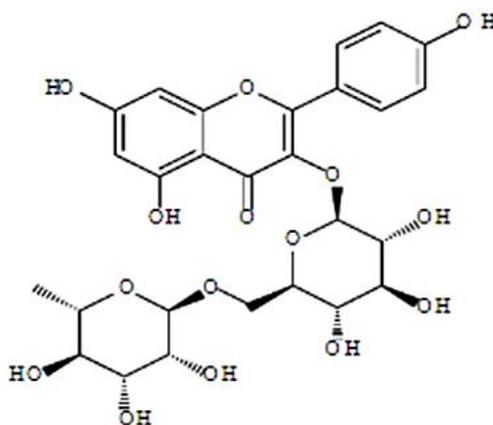


Рисунок 25 – Структурная формула никотифлорина

Спектр 1H -ЯМР (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12.52 (1H, уш. с, 5-OH-группа), 10.10 (1H, уш. с, 7-OH-группа), 9.20 (1H, уш. с, 4'-OH-группа), 7.95 (2H, д, J = 9.0, H-2' и J = H-6'), 6.83 (2H, д, J = 9.0, H-3' и H-5'), 6.36 (1H, д, J = 2.5, H-8), 6.15 (1H, д, J = 2.5, H-6), 5.25 (1H, д, J = 7.0, H-1'' глюкопиранозы), 4.33 (1H, д, 1.0 Гц, H-1''' рамнозы), 2.9-4.1 (м, 4H рамнозы и 6H глюкозы), 0.94 (3H, д, 6 Гц, CH₃ рамнозы) (рис. 26).

Спектр ^{13}C -ЯМР (100.52 МГц, DMSO-d₆, δ_C, м.д.): 178.76 (C-4), 167.69 (C-7), 160.43 (C-5), 157.04 (C-9), 148.44 (C-2 и C-4'), 133.72 (C-3), 131.39 (C-2' и C-6'), 127.49 (C-1'), 115.18 (C-3' и C-5'), 106.31 (C-10), 101.30 (C-1'' глюкозы), 99.97 (C-1''' рамнозы), 99.35 (C-6), 94.33 (C-8), 76.90 (C-5''), 76.24 (C-3''), 74.07 (C-4''), 73.77 (C-2''), 72.33 (C-4''), 71.11 (C-5'''), 70.93 (C-5'''), 70.86 (C-2'''), 70.43 (C-3'' и C-3'''), 70.10 (C-4'''), 68.92 (C-5'''), 68.77 C-6'''), 18.25 (CH₃ рамнозы).

Масс-спектр (HR-ESI-MS, 180 °C, *m/z*): 595.1164 [M+H]⁺, 617.1003 [M+Na]⁺, 633.0963 [M+K]⁺ (рис. 26).

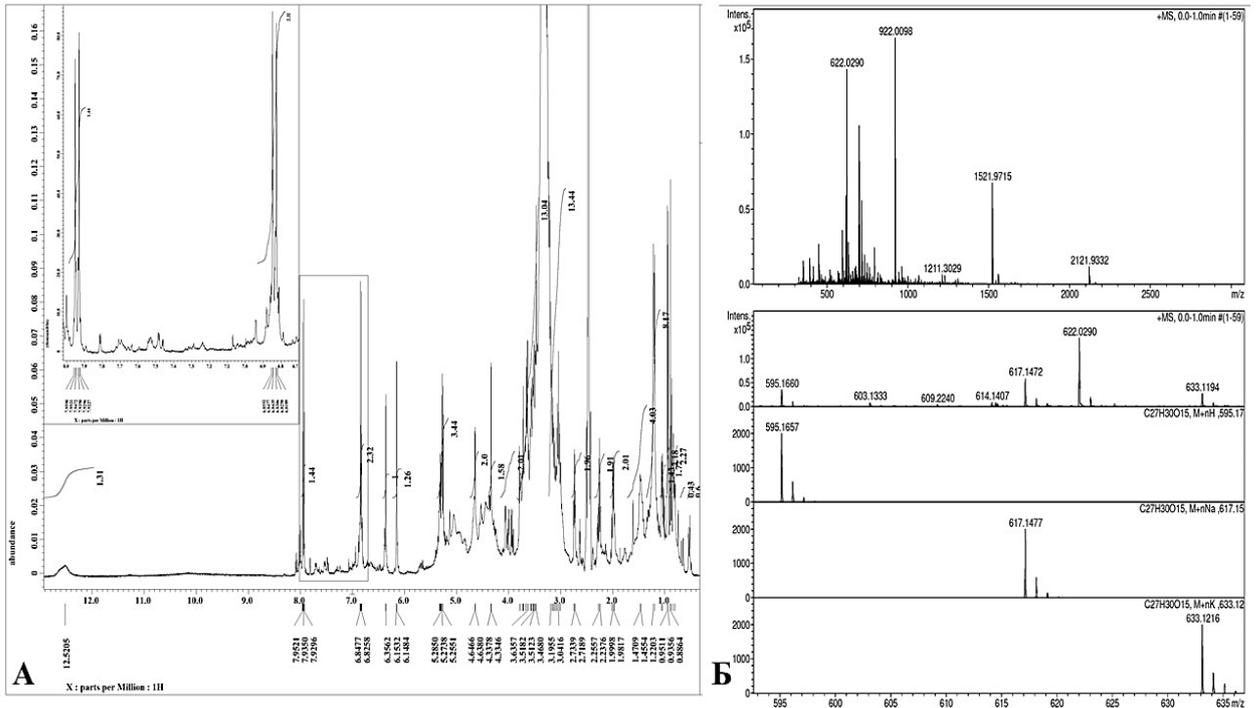


Рисунок 26 - ¹H-ЯМР-спектр никтифлорина в DMSO-d₆ (А). Масс-спектр никтифлорина (Б)

2. 3-O-β-D-[α-L-О-рамнопиранозил-(1→6)]-глюкопиранозид- [(2→1)-О-β-D-глюкопиранозил-(2→1)-О-β-D-глюкопиранозил]-3,5,6,7,4'-пентагидрокси -3'-метоксифлавона (нигелфлавонозид G). Аморфное вещество желтого цвета состава C₄₀H₅₂O₂₇. УФ-спектр (EtOH, λ_{max}, нм): 272, 343; + NaOAc 276, 340, 400 пл.; + NaOAc + H₃BO₃ 274, 340, 400 пл.; + AlCl₃ 282, 343, 415; + AlCl₃ + HCl 282, 343, 410; + NaOMe 280, 407 (рис. 27).

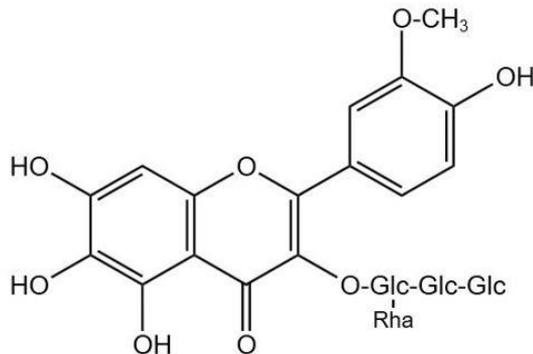


Рисунок 27 – Структурная формула нигелфлавонозида G

Спектр ^1H -ЯМР (399.78 МГц, DMSO- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12.60 (1H, с, 5-ОН-группа), 9.0-10.4 (3H, уш. с, 6-ОН-группа, 7-ОН-группа, и 4'-ОН-группа), 7.52 (1H, д, $J = 2.5$, H-2'), 7.50 (1H, дд, $J = 2.5$ и $J = 8.5$, H-6'), 6.94 (1H, с, H-8), 6.85 (1H, д, $J = 8.5$, H-5'), 5,18 (1H, д, 7.0 Гц, H-1'' глюкозы), 4,64 (1H, д, уш. с, H-1''' рамнозы), 4.55 (1H, д, 7.0 Гц, H-1'''' глюкозы), 4.25 (1H, д, 7.0 Гц, H-1''''' глюкозы), 2.9-4.2 (22H, м, 6H глюкозы + 4H рамнозы), 3.72 (3H, с, 3'-ОСН₃), 0.83 (3H, д, 6.0 Гц, 3H, СН₃ рамнозы) (рис. 28).

Спектр ^{13}C -ЯМР (100.52 МГц, DMSO- d_6 , δ_C , м.д.): 177.00 (C-4), 167.32 (C-7), 161.21 (C-5), 156.93 (C-2 и C-9), 148.46 (C-4'), 145.27 (C-3'), 135.00 (C-3), 131.00 (C-6), 121.00 (C-1'), 116.68 (C-2' и C-6'), 115.76 (C-5'), 104.00 (C-10), 102.00 (C-1'' глюкозы), 101.06 (C-1''' рамнозы, C-1'''' глюкозы и C-1''''' глюкозы), 94.00 (C-8), 77.37 (C-3'' и C-5''), 73.73 (C-4'''), 72.85 (C-2'' и C-4''), 71.19 (C-2''' и C-3'''), 68.19 (C-5''' и C-6''), 61.01 (C-6'''' и C-6'''''), 56.52 (3'-ОСН₃), 18.28 C-6''' (СН₃ рамнозы).

Масс-спектр (HR-ESI-MS, 180 °C, m/z): 965.2564 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 987.2377 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 1003.2116 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (рис. 28).

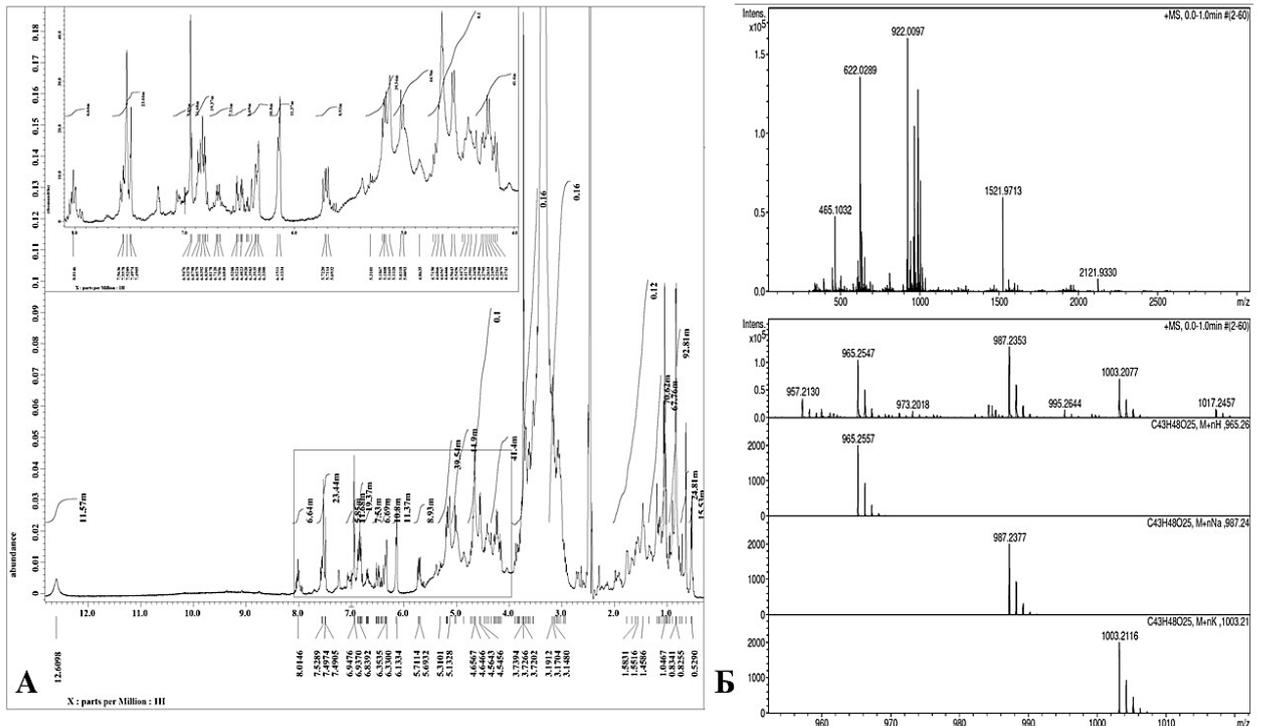


Рисунок 28 - ^1H -ЯМР-спектр нигелфлавонозида G в DMSO- d_6 (А). Масс-спектр нигелфлавонозида G (Б)

3. Рутин (3-О-β-D-глюкопиранозид кверцетина). Кристаллическое вещество желтого цвета состава $C_{27}H_{30}O_{16}$; т.пл. 192-194 °С (водный спирт). λ_{max} EtOH 258, 266 нм, 362 нм; +NaOAc 270, 303, 365; + NaOAc + H_3BO_3 270, 303, 380; + $AlCl_3$, 273, 304, 360, 412 нм; + $AlCl_3$, + HCl 273, 304, 360, 400 нм (рис. 29).

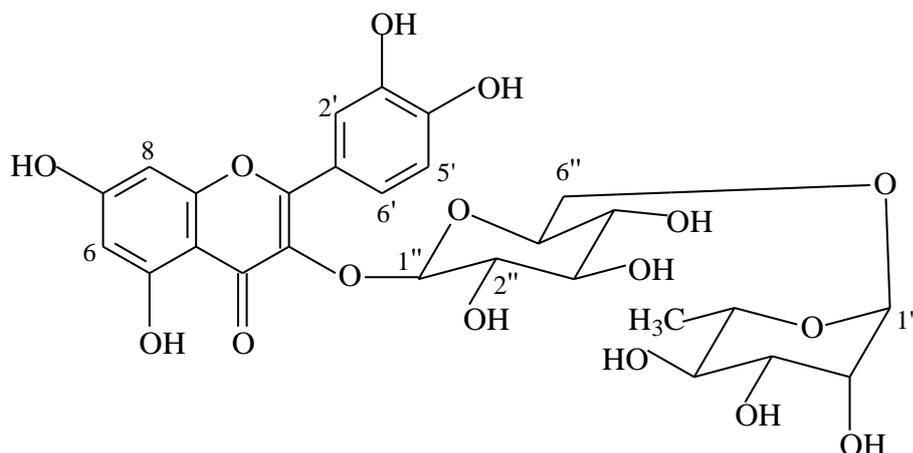


Рисунок 29 – Структурная формула рутина

Спектр 1H -ЯМР (399.78 МГц, $DMSO-d_6$, δ , м.д., J/Гц): 12.55 (1H, с, 5-OH группы), 10.63 (1H, уш. с, 7-OH), 9.60 (1H, с, 4'-OH-группа), 9.20 (1H, с, 3'-OH-группа), 7.51 (1H, дд, 2,5 и 9 Гц, H-6'), 7.48 (1H, д 9 Гц, H-2'), 6.80 (д, 9 Гц, H-5'), 6.34 (д, 2.5 Гц, H-8), 6,15 (д, 2.5 Гц, H-6), 5,30 (1H, д, 7 Гц, H-1'' глюкозы), 4,34 (1H, д, уш. с, H-1''' рамнозы), 2.9-3.8 (10H, м, 6H глюкозы + 4H рамнозы), 0.95 (3H, д, 6 Гц, 3H, CH_3 рамнозы) (рис. 30).

Спектр ^{13}C -ЯМР (100.52 МГц, $DMSO-d_6$, δ_C , м.д.): 177.36 (C-4), 166.64 (C-7), 161.21 (C-5), 156.93 (C-2 и C-9), 148.94 (C-4'), 145.27 (C-3'), 135.74 (C-3), 122.10 (C-6'), 121.64 (C-1' и C-2'), 115.64 (C-5'), 110.24 (C-10), 104.45 (C-1'' глюкозы), 101,30 (C-1''' рамнозы), 98.00 (C-6), 94.00 (C-8), 76.41 (C-5''), 75.43 (C-3''), 74.57 (C-4''), 72.34 (C-2'' и C-4''), 70.53 (и C-2''' и C-3'''), 68,76 (C-5''' и C-6''), 18,25 C-6''' (CH_3 рамнозы)

Масс-спектр (HR-ESI-MS, 180 °С, m/z): 611.1598 $[M+H]^+$, M^+ 633.1426 $[M+Na]^+$, M^+ 649.1165 $[M+K]^+$ (рис. 30).

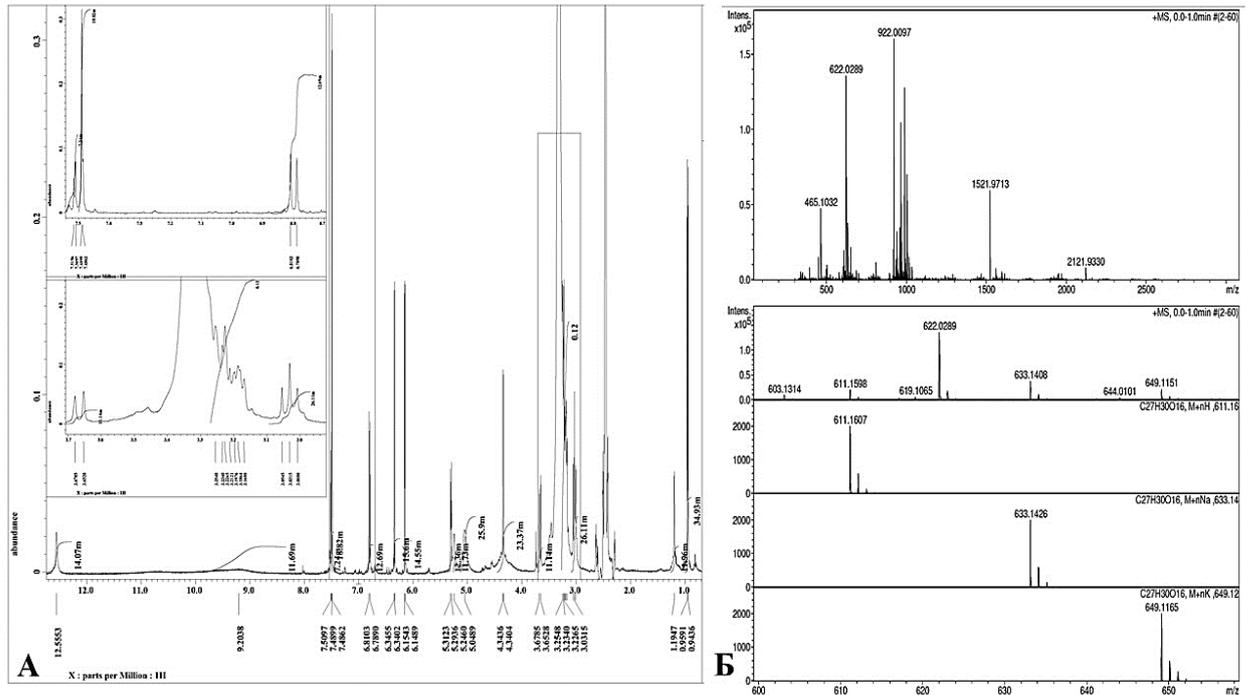


Рисунок 30 - ^1H -ЯМР-спектр рутина в DMSO-d_6 (А). Масс-спектр рутина (Б)

4. Даукостерин (3-О- β -D-глюкопиранозид β -ситостерина). Белое кристаллическое вещество состава $\text{C}_{35}\text{H}_{60}\text{O}_6$; т. пл. 312-315 $^\circ\text{C}$ (смесь хлороформа и этилового спирта) (рис. 31).

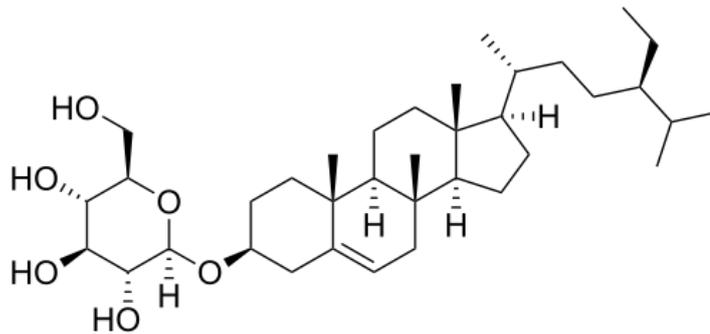


Рисунок 31 – Структурная формула даукостерина

Масс-спектр (HR-ESI-MS, 180 $^\circ\text{C}$, m/z): 599.1160 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 615.0899 $[\text{M}+\text{K}]^+$ (рис. 32).

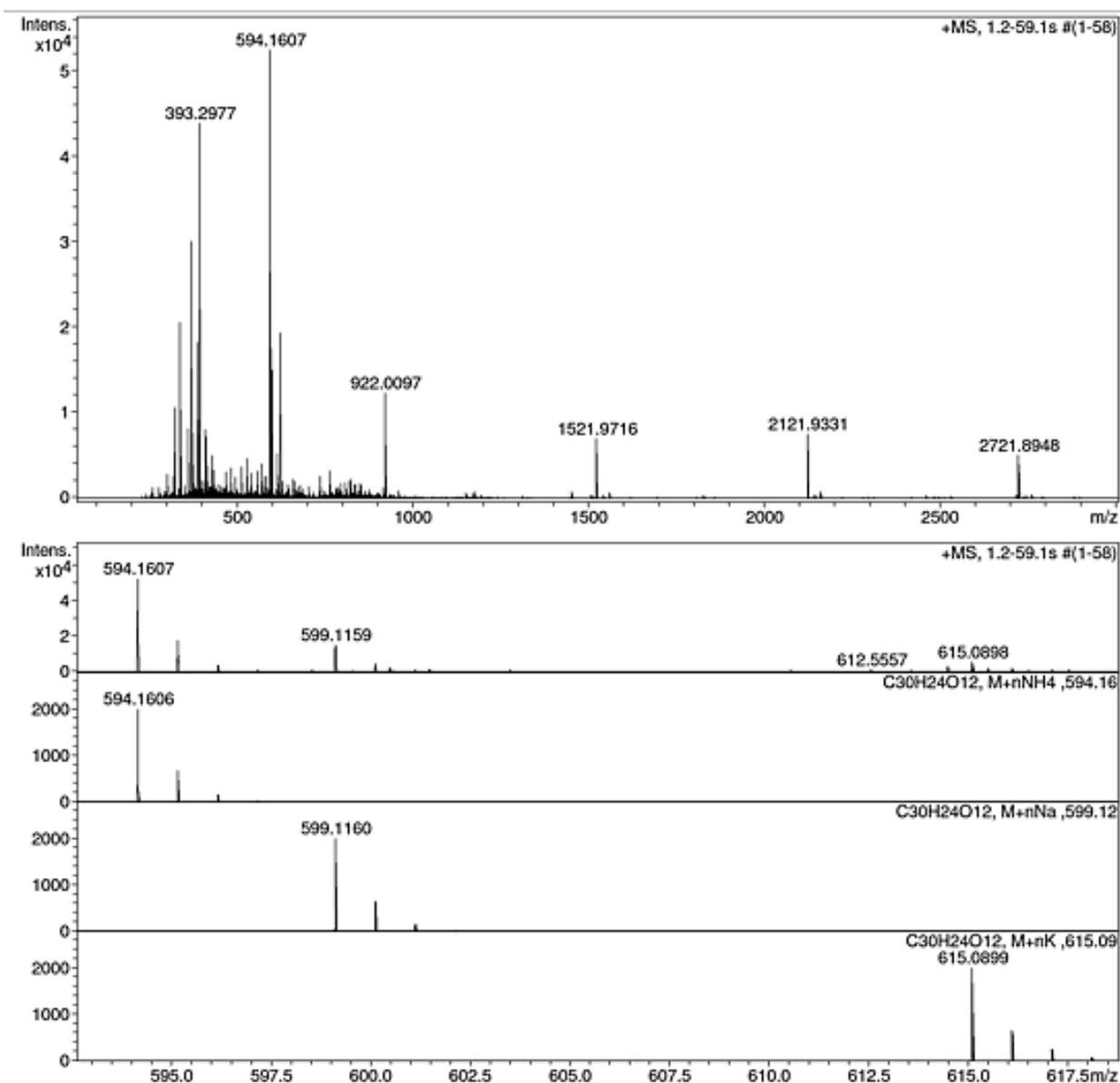


Рисунок 32 - Масс-спектр даукостерина

5. β-Ситостерин. Белое кристаллическое вещество состава C₂₉H₅₀O; т. пл. 134-136 °С (смесь хлороформа и гексана) (рис. 33).

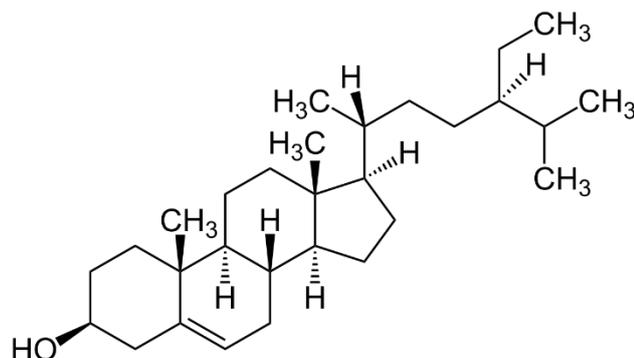


Рисунок 33 – Структурная формула β-ситостерина

Спектр ^1H -ЯМР (399.78 МГц, DMSO-d_6 , δ , м.д., J/Гц): 5,34 (1H, м, H-6), 3,52 (1H, м, H-3), 1,14-3,50 (30H, м), 1,01 (6H, с, CH_3 -19 и CH_3 -21), 0,83 (6H, с, CH_3 -26 и CH_3 -29), 0,79 (3H, с, CH_3 -27), 0,68 (3H, с, CH_3 -18) (рис. 34)..

Спектр ^{13}C -ЯМР (100.52 МГц, DMSO-d_6 , δ_{C} , м.д.): 140.83 (C-5), 121.80 (C-6), 71.89 (C-3), 56.84 (C-14), 56.02 (C-17), 50.23 (C-9), 45.91 (C-24), 42.29 (C-13), 40.58 (C-12), 39.76 (C-4), 3734 (C-1 и C-22), 36.59 (C-10), 36.23 (C-20), 31.97 (C-2), 29.00 (C-25), 28.32 (C-16), 25.49 (C-23), 24.45 (C-15), 23.11 (C-11), 19.90 (C-26), 19.48 (C-19), 19.06 (C-27), 12.33 (C-18), 12.13 (C-29) (рис. 35).

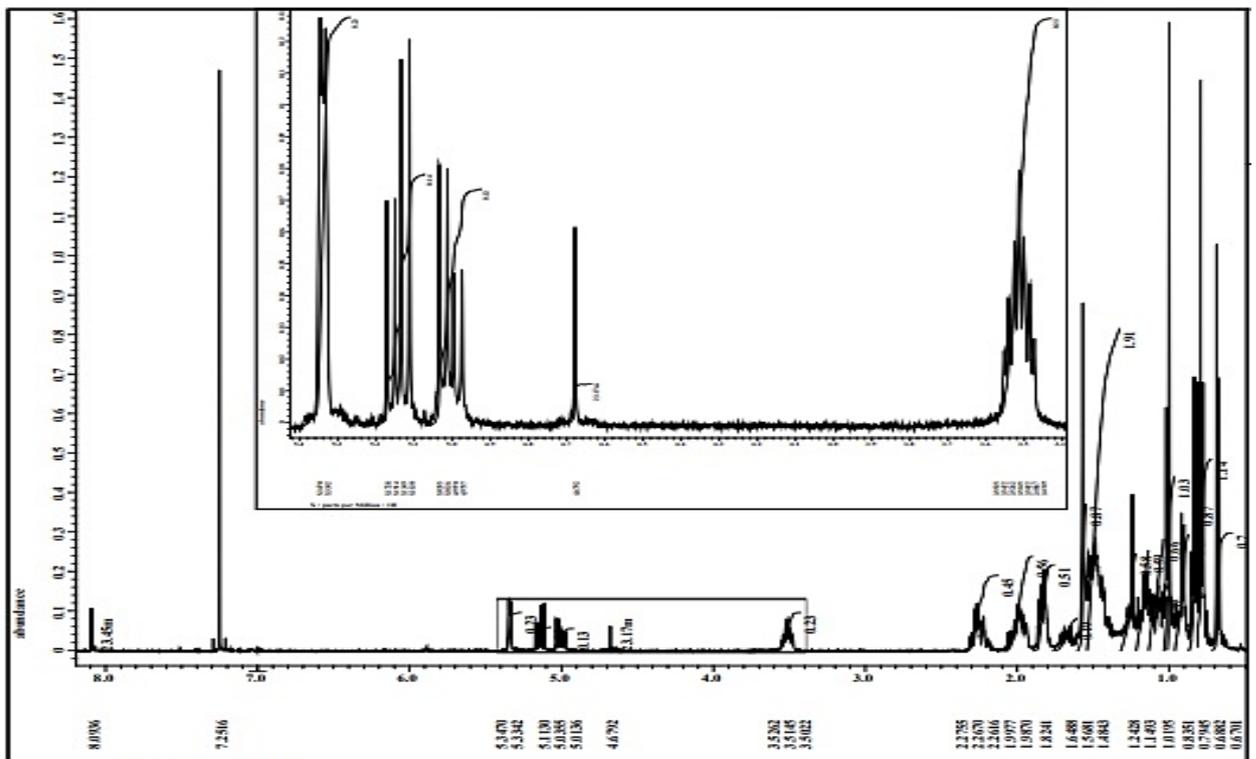


Рисунок 34 - ^1H -ЯМР-спектр β -ситостерина в дейтерохлороформе

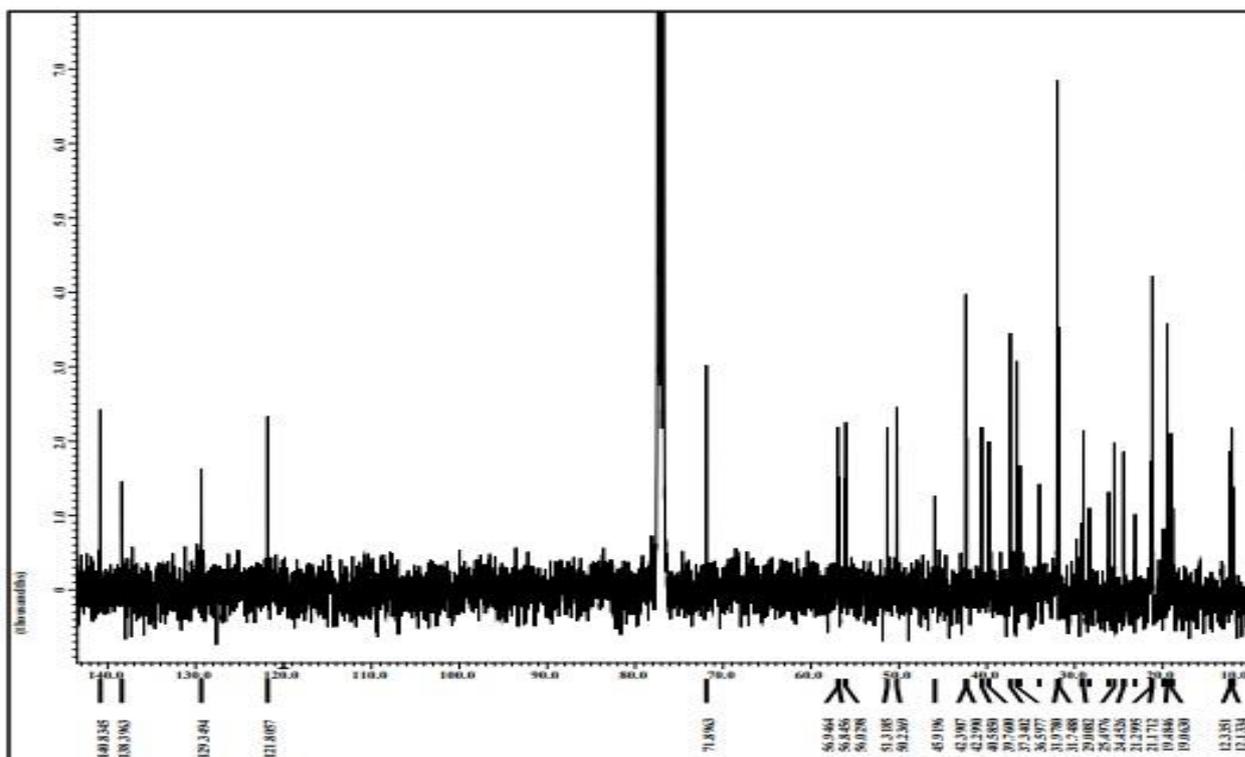


Рисунок 35 – ^{13}C -ЯМР-спектр β -ситостерина в дейтерохлороформе

Таким образом, методом адсорбционной колоночной хроматографии было проведено фитохимическое исследование состава травы чернушки посевной, вследствие которого были выделены с установлением их структуры вещества флавоноидной и стерина природы.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Впервые из травы чернушки посевной (*Nigella sativa* L.) методом адсорбционной колоночной хроматографии были выделены вещества *нигелфлавонозид G* (3-О-β-D-[α-L-О-рамнопиранозил-(1→6)]-глюкопиранозид-[(2→1)-О-β-D-глюкопиранозил-(2→1)-О-β-D-глюкопиранозил]-3,5,6,7,4'-пентагидрокси-3'-метоксифлавона) и *даукостерин* (3-О-β-D-глюкопиранозид β-ситостерина) и идентифицированы с использованием методов УФ-, ¹H-ЯМР-, ¹³C-ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, а также результатов химических превращений. Следует отметить, что *нигелфлавонозид G* (3-О-β-D-[α-L-О-рамнопиранозил-(1→6)]-глюкопиранозид-[(2→1)-О-β-D-глюкопиранозил-(2→1)-О-β-D-глюкопиранозил]-3,5,6,7,4'-пентагидрокси-3'-метоксифлавона) является новым выделенным и идентифицированным природным соединением.
2. Впервые в РФ были проведены выделение и идентификация БАС из травы чернушки посевной, культивируемой на территории РФ - никотифлорина (3-О-β-D-глюкопиранозид кемпферола), рутина и β-ситостерина.
3. Полученные данные о химическом составе травы чернушки посевной были использованы при разработке методик стандартизации травы чернушки посевной, а также при определении числовых показателей нового вида ЛРС «Чернушки посевной трава».

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ТРАВЫ И МАСЛА ЧЕРНУШКИ ПОСЕВНОЙ (*NIGELLA SATIVA* L.)

Для введения в медицинскую и фармацевтическую практику новых перспективных препаратов на основе травы ч. посевной необходимо включение соответствующего лекарственного растительного сырья в Государственную фармакопею РФ. Соответственно, помимо микроскопического анализа сырья необходимо проведение комплекса фармакогностических и химических исследований. На данный момент в Государственной фармакопее РФ отсутствует ФС на данный вид ЛРС.

С учетом возможности использования масла чернушки в фармацевтической и парафармацевтической практике, интерес представляет исследование жирнокислотного состава масла ч. посевной путём сравнительного анализа состава масел из различных географических регионов [65, 88, 97, 131, 166]. Анализ позволит установить жирнокислотный профиль масла и объяснить возможные фармакологические эффекты.

Данный раздел посвящен разработке методик качественного и количественного анализа основных групп БАС в траве ч. посевной с использованием химических (пробирочных реакций) и физико-химических (хроматографических и оптических) методов анализа.

5.1. Качественный анализ травы чернушки посевной химическими методами

Основные качественные пробирочные и другие характерные химические реакции, проведенные для подтверждения ранее установленного химического состава (основных групп БАС в сырье) извлечений травы ч. посевной, приведены в таблице 10.

Таблица 10 – Основные характерные качественные химические реакции

№ п/п	Реактивы (реакция)/группа БАС	Описание методики	Аналитический эффект
1	Раствор железа (III) хлорида (<i>дубильные вещества</i>)	К 1-2 мл извлечения добавляют 2 мл 1% спиртового раствора железа (III) хлорида.	Коричневое или темно-зеленое окрашивание раствора.
2	3% раствор алюминия (III) хлорида (<i>фенольные соединения</i>)	К 1-2 мл извлечения добавляют 2 мл 3% раствора алюминия (III) хлорида спиртового.	Желтая окраска раствора. Люминесценция раствора при $\lambda=365$ нм.
3	Щелочной раствор диазобензол-сульфокислоты (ДСК) (<i>фенольные соединения</i>)	К 1-2 мл извлечения добавляют 1-2 капли раствора ДСК.	Темно-желтое окрашивание раствора.
4	Цианидиновая реакция (<i>флавоноиды</i>)	К 1-2 мл извлечения добавляется металлический цинк в среде концентрированной хлористоводородной кислоты.	Розовый цвет раствора.
5	Цианидиновая реакция по Брианту (<i>флавоноиды</i>)	Продолжение реакции, описанной выше. Полученный раствор разводят водой очищенной 1:1, добавляют небольшое количество <i>n</i> -бутанола.	Темно-коричневое окрашивание раствора.
6	Реакция Вильсона (<i>5-оксифлавоны и 5-оксифлавонолы</i>)	К 2 мл извлечения добавляют 2 капли борной кислоты, после изменения окраски - лимонную кислоту.	Желтое окрашивание раствора. После добавления лимонной кислоты - обесцвечивание раствора.
7	Реакция кислотного гидролиза (<i>гликозиды</i>)	К 5-10 мг гликозида добавляют 3 мл 2-4% раствора хлористоводородной кислоты с последующим нагреванием на водяной бане не менее 1 ч.	Выпадение кристаллического осадка.

8	Реакция ферментативного гидролиза (гликозиды)	5 мг гликозида растворяют в 2 мл воды очищенной и добавляют 1-2 мл раствора β -глюкозидазы (1-2 мг β -глюкозидазы), далее термостатируют при 38°C – 24 ч.	Выпадение кристаллического осадка.
9	Щелочной гидролиз (фенольные соединения)	К 1-2 мл извлечения добавляют 2 мл 1-2% раствора гидроксида натрия (NaOH или KOH).	Яркая оранжевая окраска раствора.

В ходе проведенного качественного анализа методом пробирочных (цветных) реакций получены первичные характерные показатели ожидаемых аналитических эффектов для водно-спиртовых извлечений травы ч. посевной.

5.2. Качественный анализ травы чернушки посевной методами ТСХ и УФ-спектрофотометрии

С учетом ранее проведенного выделения и идентификации диагностически значимых соединений из травы ч. посевной флавоноидной природы – *никотифлорина*, *рутина* и нового соединения - *нигелфлавонозида G*, нами разработана методика качественного определения БАС в сырье и извлечениях на основе травы ч. посевной методом тонкослойной хроматографии (см. Глава 4. Фитохимическое исследование травы чернушки посевной, рис. 24).

В качестве характерных и доступных веществ-свидетелей мы предлагаем использовать СО рутина и СО никотифлорина (рис. 36).

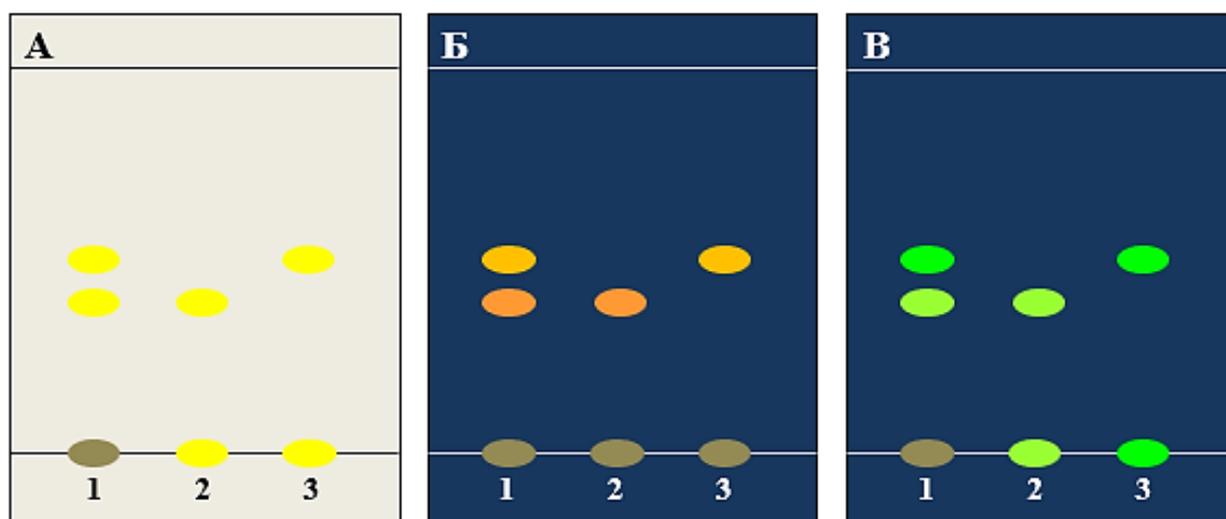


Рисунок 36 – Схемы хроматограмм водно-спиртового извлечения травы чернушки посевной в системе растворителей хлороформ: этанол: вода (25:18:2): А – детекция в видимом свете; Б – детекция в УФ-свете (365 нм); В - детекция после обработки спиртовым раствором хлорида алюминия в УФ-свете (365 нм)

Обозначения: 1– 70% водно-спиртовое извлечение; 2 – СО рутина, 3 – СО никотифлорина.

При исследовании извлечений из травы чернушки посевной методом ТСХ установлены соответствующие хроматографические зоны адсорбции, характерные в данной системе растворителей - хлороформ: этанол: вода (25:18:2), для веществ-свидетелей – СО рутина ($R_f=0,40$) и СО никотифлорина ($R_f =0,48$). При отсутствии СО никотифлорина возможно использовать показатель R_{st} :

$$R_{st}(\text{никотифлорина}) = R_f(\text{никотифлорина}; 0,48) / R_f(\text{рутина}; 0,40) = 1,20$$

Основные параметры определения и аналитические эффекты при использовании физических и химических методов детекции представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Варианты детектирования в ТСХ-анализе

Способ детекции	Описание и аналитический эффект
Детекция в видимом свете (до и после проявления раствором ДСК)	<u>До проявления:</u> Зоны адсорбции желтого цвета на уровне СО рутина и СО никотифлорина. <u>После проявления:</u>

	<ul style="list-style-type: none"> - зона адсорбции, соответствующая <i>СО рутина</i> – коричневого цвета; - зона адсорбции, соответствующая <i>СО никотифлорина</i> – темно-желтого цвета.
Детекция в УФ- свете при 254 нм	Зоны адсорбции фиолетового цвета
Детекция в УФ- свете при 365 нм (до и после проявления спиртовым раствором $AlCl_3$)	<p><u>До проявления:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - зона адсорбции, соответствующая <i>СО рутина</i> – темно-желтого цвета; - зона адсорбции, соответствующая <i>СО никотифлорина</i> – желтого цвета. <p><u>После проявления:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> - зона адсорбции, соответствующая <i>СО рутина</i> – свечение желто-зеленого цвета; - зона адсорбции, соответствующая <i>СО никотифлорина</i> – свечение зеленого цвета.

Методика определения основных групп БАС (флавоноидов) в сырье и экстракционных препаратах на основе травы чернушки посевной. Испытуемое извлечение травы ч. посевной, спиртовые растворы *СО рутина* и *СО никотифлорина* объемом 20 мкл с помощью стеклянной микропипетки наносят на линию старта аналитической хроматографической пластинки с сорбентом (силикагель).

Пластинку с нанесенными пробами просушивают, погружают в хроматографическую камеру с элюентной системой хлороформ : этанол : вода (28:15:2) и хроматографируют восходящим способом. После достижения фронтом элюентной системы 80-90% длины пластинки, ее извлекают из хроматографической камеры, высушивают до удаления следов элюентов и просматривают в видимом и ультрафиолетовом свете при длине волны 365 нм [51].

Затем пластинку обрабатывают 3% спиртовым раствором $AlCl_3$ и просматривают в УФ-свете при $\lambda=365$ нм [51]. Затем ТСХ-пластинку обрабатывают щелочным раствором диазобензолсульфокислоты.

Данная методика применима как для определения подлинности травы чернушки посевной (*Nigella sativa* L.), так и для оценки качества экстракционных препаратов на основе травы ч. посевной.

Также для определения подлинности и качества сырья и экстракционных препаратов рекомендовано проведение *спектрофотометрического анализа*.

Растворы извлечений травы ч. посевной после фотометрирования имеют следующие максимумы поглощения, характерные для веществ группы флавоноидов, что объяснено в следующем разделе (табл. 12).

Таблица 12 – Максимумы поглощения растворов извлечений травы чернушки посевной

Способ фотометрии	Максимумы поглощения
Прямой	$\lambda_{max1} = 266 \pm 2$ нм $\lambda_{max2} = 340 \pm 2$ нм
Прямой + 3% спиртовой раствор $AlCl_3$	$\lambda_{max1} = 275 \pm 2$ нм $\lambda_{max2} = 340 \pm 2$ нм $\lambda_{max3} = 408 \pm 2$ нм
Дифференциальный (после 3% спиртового раствора $AlCl_3$)	$\lambda_{max3} = 410 \pm 2$ нм

Таким образом, характер спектров поглощения извлечений травы ч. посевной также подтверждает данные ТСХ-анализа и целесообразность использования в качестве стандартного образца рутина при разработке методик количественного анализа сырья и экстракционных препаратов из травы ч. посевной.

5.3. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве чернушки посевной

Для разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в траве ч. посевной проводилось спектрофотометрическое определение и анализ УФ-спектров из полученных водно-спиртовых извлечений данного сырья [50]. Выявлены характерные максимумы поглощения для веществ группы флавоноидов (табл. 12) [20, 33]. Наблюдался характерный батохромный сдвиг максимумов поглощения флавоноидов при использовании соответствующего реактива - 3% спиртового раствора $AlCl_3$

(рис. 37), аналогичный раствору СО рутина (рис. 38) [32]. Следует отметить характерную особенность УФ-спектров водного-спиртовых извлечений из травы ч. посевной: помимо характерного сдвига в длинноволновой области из $\lambda_{max} = 340 \pm 2$ нм в $\lambda_{max} = 408 \pm 2$ нм, также наблюдается отдельный максимум $\lambda_{max} = 340 \pm 2$ нм (рис. 37).

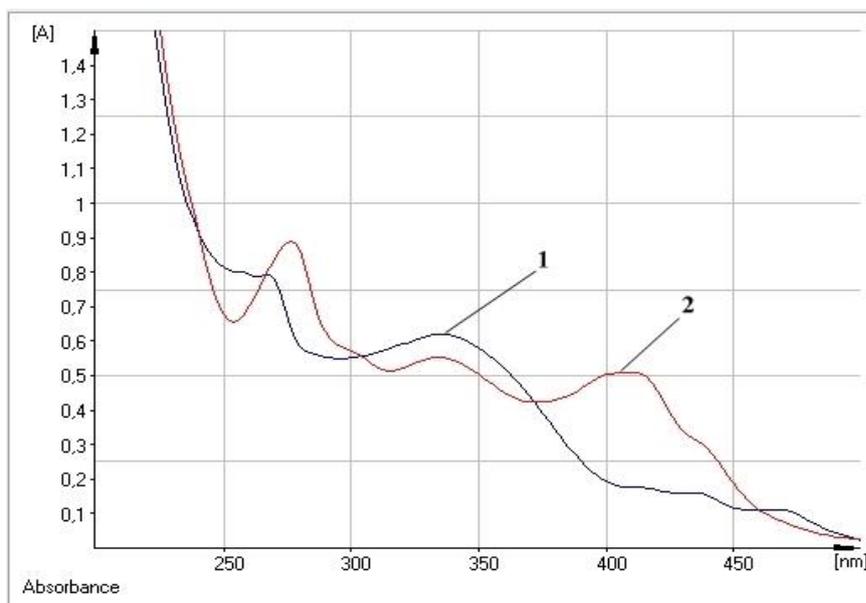


Рисунок 37 – Спектры поглощения водного-спиртового извлечения травы *Nigella sativa* L.

Обозначения: 1 – раствор извлечения; 2 – раствор извлечения с добавлением алюминия хлорида

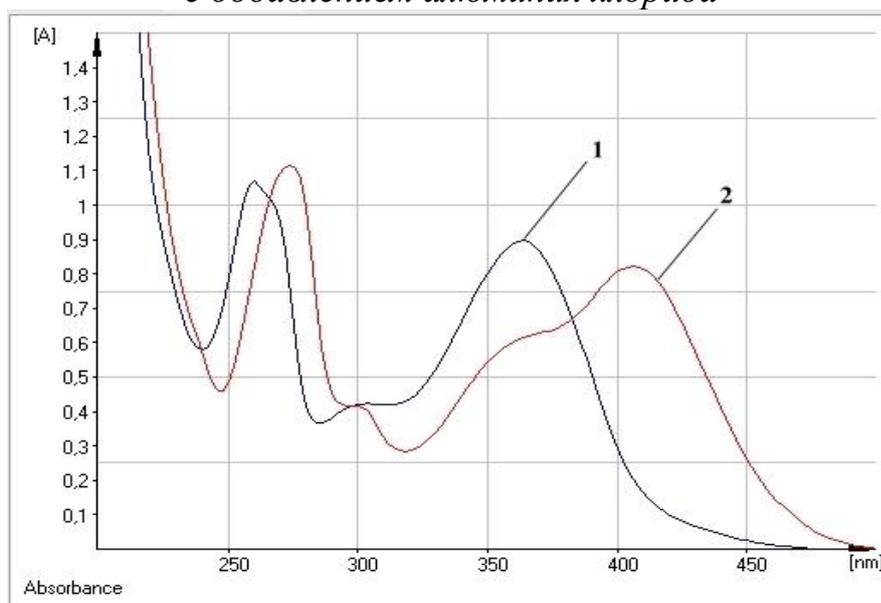


Рисунок 38 – Спектры поглощения растворов СО рутина.

Обозначения: 1 – раствор СО рутина; 2 – раствор СО рутина с добавлением алюминия хлорида

С учетом ранее проведенной идентификации в составе сырья рутина (см. Глава 4) и схожести дифференциальных УФ-спектров всех исследуемых извлечений и СО рутина предлагается расчёт суммы флавоноидов в пересчете на СО рутина при $\lambda_{\max} = 410 \pm 2$ нм (рис. 39).

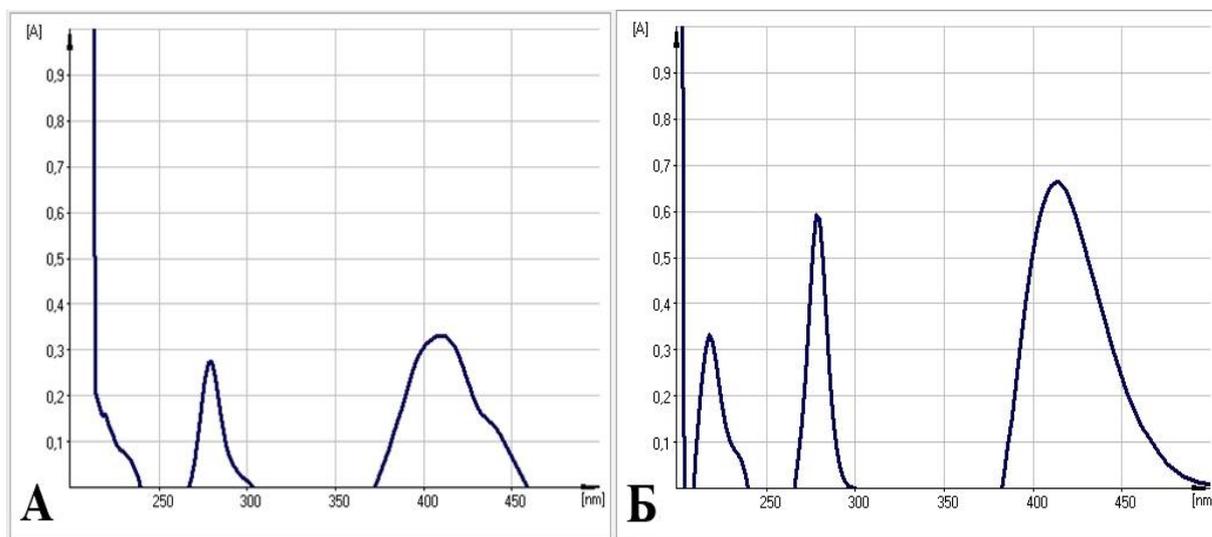


Рисунок 39 – Дифференциальные спектры поглощения водного-спиртового извлечения из травы *Nigella sativa* L. и раствора СО рутина. А – раствор извлечения; Б – раствор СО рутина

В процессе эксперимента по подбору оптимальных параметров пробоподготовки и условий выделения флавоноидов из травы ч. посевной для количественного анализа суммы флавоноидов в пересёте на рутин были определены следующие параметры: экстрагент - 70% этиловый спирт; соотношение «сырьё-экстрагент» – 1:30; время экстракции – извлечение на кипящей водяной бане в течение 45 мин, степень измельчения сырья – 2 мм (табл. 13) [50].

Таблица 13 – Определение оптимальных условий экстракции суммы флавоноидов из травы *Nigella sativa* L.

№	Экстрагент	Соотношение сырье-экстрагент	Время экстракции мин	Степень измельчения, мм	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье (в %)
I. Выбор экстрагента					
1	40% этиловый спирт	1:30	60	2	0,96±0,15%
2	50% этиловый спирт				0,96±0,16%
3	60% этиловый спирт				1,01±0,14%
4	70% этиловый спирт				1,10±0,15%
5	80% этиловый спирт				1,09±0,15%
6	90% этиловый спирт				0,99±0,14%
7	96% этиловый спирт				0,61±0,08%
II. Определение времени экстракции					
8	70% этиловый спирт	1:30	30	2	1,13±0,16%
9			45		1,17±0,16%
10			60		1,07±0,15%
11			90		1,09±0,15%
12			120		1,00±0,14%
III. Выбор степени измельчения					
13	70% этиловый спирт	1:30	45	1	2,43±0,19%
14				2	1,31±0,18%
15				3	1,03±0,14%
IV. Определение соотношения «сырье–экстрагент»					
16	70% этиловый спирт	1:20	45	2	1,05±0,15%
17		1:30			1,17±0,16%
18		1:50			1,20±0,17%

Стоит отметить, что степень измельчения сырья в 1 мм не является оптимальным вариантом, так как при тонком измельчении (меньше 2 мм) сырьё распределяется неравномерно, а именно удельный вес цветков в аналитической пробе значительно возрастает, что даёт завышенный результат анализа [50]. Кроме того, более тонкое измельчение затрудняет очистку извлечений и увеличивает количество различных балластных компонентов в составе извлечения. Также при выборе соотношения «сырье-экстрагент» было выбрано значение 1:30, так как далее значения содержания суммы флавоноидов выходят на плато (табл. 13) [50]. Влажность (W) используемого сырья составила $8,71 \pm 0,12\%$ [50].

Зависимость оптической плотности от концентрации рутина описывалась графиком линейной регрессии в диапазоне концентраций от 8 до 41 мкг/мл (рис. 40).

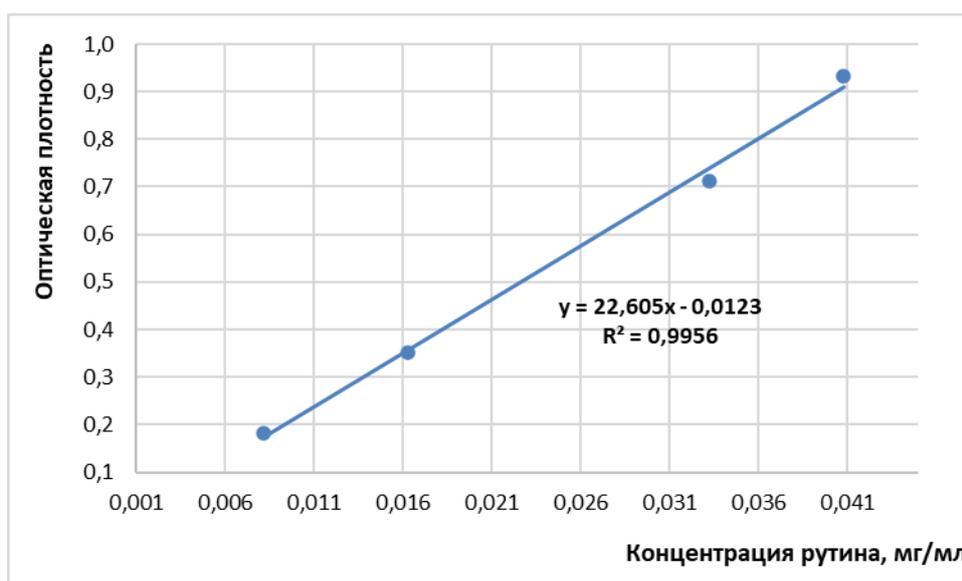


Рисунок 40 – Градуировочный график зависимости оптической плотности от концентрации рутина методом спектрофотометрии

Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве чернушки посевной. Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл 70 % этилового спирта.

Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 45 мин. Затем ее охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр «красная полоса» (*раствор А испытуемого извлечения*). 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (*раствор В испытуемого извлечения*). Оптическую плотность раствора В испытуемого извлечения измеряют на спектрофотометре при длине волны 412 нм через 40 минут после приготовления. В качестве раствора сравнения используют раствор А испытуемого извлечения.

Примечание: *Приготовление растворов СО рутина.* Около 0,02 г (точная навеска) рутина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл 70% этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 70% этиловым спиртом до метки (*раствор А рутина*). 2 мл раствора А рутина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (*испытываемый раствор В рутина*). Далее проводится анализ аналогично испытуемым растворам извлечения [50].

Содержание суммы флавоноидов (X в процентах) в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$x = \frac{A * m_0 * 30 * 25 * 2 * 100 * 100}{A_0 * m * 50 * 25 * (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора СО рутина;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса СО рутина, г;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Также в целях количественного определения суммы флавоноидов в пересчёте на рутин в случае отсутствия стандартного образца рутина для расчета целесообразно использовать экспериментально рассчитанное значение удельного показателя поглощения при $\lambda=412$ нм равное 231 [50]:

$$x = \frac{A * 30 * 25 * 100}{m * 231 * (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, г;

231 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) СО рутина при 412 нм;

W – потеря в массе при высушивании в процентах.

Метрологические характеристики предлагаемой методики количественного определения суммы флавоноидов в траве ч. посевной описаны в таблице 14. Статистическая обработка проведенных опытов показывает, что относительная погрешность единичного определения суммы флавоноидов в траве ч. посевной составляет $\pm 13,82$ %. Относительная погрешность определения среднего значения составляет $\pm 4,17$ % при доверительной вероятности равной 95 % [50] (табл. 14).

Таблица 14 – Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в траве чернушки посевной

n	f	$\bar{X},\%$	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	P,%	t (P, f)	$\pm\Delta X$	$\pm\Delta\bar{X}$	E,%	$\bar{E},\%$
11	10	1,17	0,0053	0,073	0,022	95	2,23	0,16	0,05	$\pm 13,82$	$\pm 4,17$

Валидацию аналитической методики проводили по параметрам: специфичность, линейность, правильность. Специфичность методики определяли по соответствию дифференциальных максимумов поглощения флавоноидов травы *Nigella sativa* L. и СО рутина с $AlCl_3$ [50]. Линейную зависимость оптической плотности от концентрации в диапазоне от 8 до 41 мкг/мл СО рутина определяли с использованием серии из 4 проб стандартного образца. Коэффициент детерминации при этом составил 0,9956 (рис. 40).

Методом добавок определяли правильность разработанной методики. Систематическая ошибка проведенного анализа (δ) составила – 4,22 %. Погрешность, определяемая для проб с добавками рутина (25 %, 50 % и 75 %), находилась в пределах относительной погрешности единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической погрешности (таблица 15) [50].

Таблица 15 – Результаты определения правильности методики количественного анализа суммы флавоноидов (в пересчете на рутин) в траве чернушки посевной

Исходное содержание суммы флавоноидов, мкг/мл	Добавлено рутина, мкг/мл	Содержание суммы флавоноидов, мкг/мл		Ошибка	
		расчётное	найденное	абсолютная, мг/мл	относительная, %
15,60	3,90	19,50	18,67	-0,83	-4,26
15,60	7,80	23,40	24,38	+0,98	+4,18
15,60	11,70	27,30	28,45	+1,15	+4,21
<i>Систематическая ошибка</i>				<i>0,99</i>	<i>4,22</i>

С использованием разработанной методики были проанализированы образцы ч. посевной из Ульяновской и Самарской области и при этом определено, что содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин варьирует в зависимости от географического расположения и условий произрастания от $1,17 \pm 0,16$ % до $1,71 \pm 0,22$ % [50] (табл. 16).

Таблица 16 – Содержание суммы флавоноидов в траве чернушки посевной

№ п/п	Время и место заготовки травы чернушки посевной	Содержание суммы флавоноидов в сырье
1.	Самарская обл., г. Самара, Ботанический сад Самарского университета, июль 2021 г.	$1,17 \pm 0,16$

2.	Ульяновская обл., Чердаклинский р-н, июль 2021 г.	1,71±0,22
----	--	-----------

5.4. Анализ динамики накопления флавоноидов в траве чернушки посевной

На протяжении вегетативного периода растения под влиянием условий окружающей среды содержание БАС может периодически колебаться. Поэтому существует необходимость в определении уровня содержания и динамики биоаккумуляции действующих соединений в траве ч. посевной для выработки рекомендаций по рациональной заговке ЛРС ч. посевной.

Биоаккумуляция действующих соединений изучалась на образцах травы ч. посевной, собранной во время вегетативного периода с мая по сентябрь 2020-2022 годов в Чердаклинском районе (Ульяновская область). Из собранного сырья получали водно-спиртовые извлечения травы растения, также использовали раствор СО рутина и проводили анализ полученных растворов методом дифференциальной спектрофотометрии при $\lambda=412$ нм по разработанной и описанной ранее методике.

По результатам проведенного анализа динамики накопления БАС группы флавоноидов в траве ч. посевной было отмечено, что содержание флавоноидов в траве ч. посевной варьирует в течение всего вегетативного периода (рис. 41).

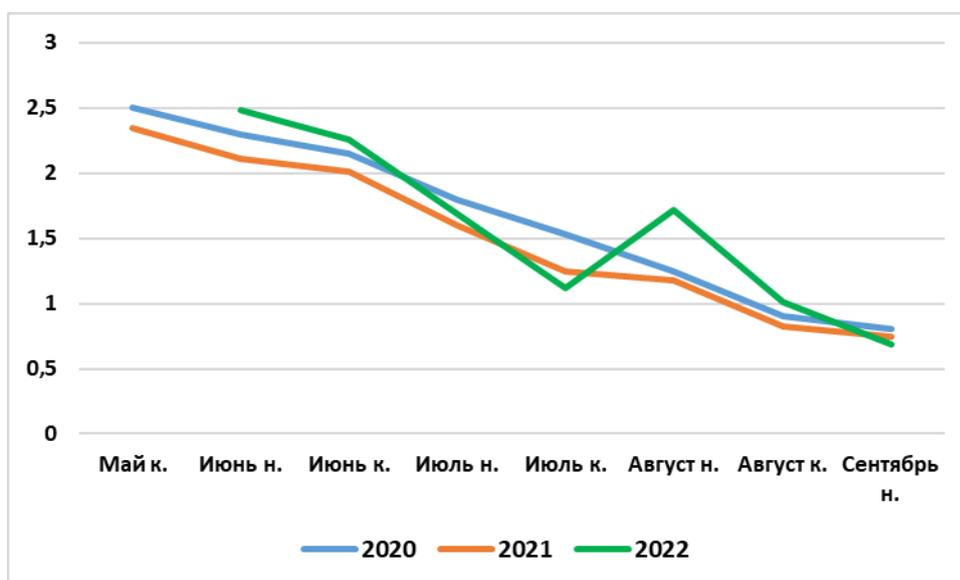


Рисунок 41 – Динамика накопления флавоноидов в траве *Nigella sativa* L.

В целом, в течение 3 лет отмечалось постепенное снижение концентрации уровня флавоноидов по мере развития побега, однако в некоторых случаях наблюдалось повышение или более плавное снижение содержания – в конце июля - начале августа, что соответствует фазе цветения растения и постепенному переходу к плодоношению (рис. 41).

Данные по динамике накопления суммы флавоноидов в траве ч. посевной за весь период исследования (2022 – 2022 гг.) представлены в приложении №2.

В рамках рационального и комплексного использования всего растения чернушки посевной (*Nigella sativa* L.), а именно семян и травы ч. посевной, рекомендуется производить сбор травы одновременно с семенами (до пожелтения травы) в фазе активного плодоношения в августе. Нижний предел содержания суммы флавоноидов в траве в этом случае составляет: не менее 1,0 %. Если выращивание ч. посевной происходит в менее благополучных регионах и видов на урожай семян не предвидится, то следует заготовить траву (и использовать ее, в частности, для приготовления настойки) в стадию цветения, когда содержание суммы флавоноидов достигает 2,0 %.

5.5. Определение общих показателей качества перспективного лекарственного растительного сырья «Чернушки посевной трава»

В целях разработки проекта фармакопейной статьи «Чернушки посевной трава» для ГФ РФ необходимо изучение нормируемых значений предъявляемых в соответствии с ОФС «Травы» ГФ РФ XIV издания для цельного и измельченного сырья [12].

Были проанализированы и предложены соответствующие нормативные показатели качества сырья «Чернушки посевной трава», которые представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Нормируемые числовые показатели ЛРС -
«Чернушки посевной трава»

Испытания	Показатели для цельного сырья	Показатели для измельченного сырья
Влажность	не более 12 %	не более 12 %
Зола общая	не более 13 %	не более 13 %
Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте	не более 3 %	не более 3 %
<i>Измельченность сырья</i>		
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями с размером 1 мм	не более 5 %	-
Частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями с размером 7 мм	-	не более 5 %
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями с размером 0,5 мм	-	не более 5 %
<i>Посторонние примеси</i>		
Стеблей	не более 60 %	не более 60 %
Части, изменившие окраску (пожелтевшие или потемневшие)	не более 3 %	не более 3 %
Органическая примесь	не более 2 %	не более 2 %
Минеральная примесь	не более 1,5 %	не более 1,5 %
<i>Количественное определение</i>		
Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин	не менее 1,0%	не менее 1,0%
Экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70%	не менее 15%	не менее 15%

Результаты определения показателей качества сырья травы ч. посевной включены в соответствующий проект ФС на новый вид ЛРС – «Чернушки посевной трава». На основании полученных данных также рекомендован срок хранения сырья – не более 2-х лет с момента сбора сырья. Для сырья травы *Nigella sativa* L. рекомендуется как оптимальное значение нижнего предела содержания флавоноидов – не менее 1,0 % (в пересчёте на рутин).

5.6. Сравнительный анализ жирнокислотного состава масел чернушки посевной различных регионов произрастания

Масло ч. посевной (*масло черного тмина*) является наиболее ценным продуктом растения и представляет большой интерес для использования в медицине, парфюмерии и, в целом, в масложировой промышленности стран Ближнего востока и Индии [88, 97, 99, 115, 136, 175]. С учетом описанных для данного масла многочисленных положительных фармакологических эффектов (гепатопротекторное, антисклеротическое, противомикробное, противовирусное и других) [106, 108, 120, 124, 142, 153] и учитывая широкую географию произрастания ч. посевной, представляет интерес изучение стабильности жирнокислотного состава основной группы биологически активных соединений (БАС) – жирного масла, а также решение вопросов идентификации и определения качества по жирнокислотному профилю. Кроме того, фальсификация растительных масел, в частности, близкими по жирнокислотному составу маслами иного происхождения (что ведет к изменению фармакологического действия, органолептических свойств и срока годности), является, на наш взгляд, актуальной и наукоемкой проблемой [49].

Изучение жирнокислотного состава масел ч. посевной проводили методом газовой хроматографии с масс-селективным детектированием (ГХ-МС) после предварительного перевода жирных кислот в метиловые эфиры (см. 2.2.3. *Хроматографические методы анализа*).

Был установлен состав жирных масел ч. посевной (Египет, Пакистан, Саудовская Аравия) и идентифицировано 29 компонентов масел (жирные

кислоты и терпеноиды) [49]. В жирнокислотном профиле характерно доминирование ненасыщенных жирных кислот (до 90 % и выше) – линолевой, олеиновой, незначительно содержание эйкозодиеновой и в минорном количестве представлена линоленовая кислота [49]. Также присутствуют насыщенные жирные кислоты (в большинстве образцов - менее 10 %) – пальмитиновая и стеариновая [49]. Всего обнаружено было 15 жирных кислот (количество идентифицированных жирных кислот варьировало в образцах) (см. приложения №3 и №4). Основной жирнокислотный состав представлен в таблице 18.

Таблица 18 – Жирнокислотный состав масел чернушки посевной

№ п / п	Жирные кислоты	«Egyptian Black Seed Oil» (Египет), %	«Масло Королевское» (Египет), %	«Black seeds oil» (Пакистан), %	«Huile de Nigelle» (Саудовская Аравия), %	«Золото Эфиопии» (Египет), %
1	Пальмитиновая кислота ($C_{16:0}$)	9,26±0,54	3,97±0,26	6,41±0,43	12,36±0,62	7,60±0,33
2	Линолевая кислота ($C_{18:2}$)	64,08±0,61	36,64±0,42	63,33±0,57	48,92±0,54	64,82±0,62
3	Олеиновая кислота ($C_{18:1}$)	23,32±0,33	55,84±0,58	26,56±0,34	31,53±0,42	24,09±0,33
4	11-октадеценовая кислота ($C_{18:1}$)	0,45±0,03	–	0,63±0,04	1,79±0,12	0,47±0,05
5	Линоленовая кислота ($C_{18:3}$)	-	0,24±0,02	0,02±0,00 1	-	-
6	Стеариновая кислота ($C_{18:0}$)	1,30±0,08	1,24±0,08	1,41±0,09	2,62±0,17	1,42±0,08
7	Эйкозодиеновая кислота ($C_{20:2}$)	0,87±0,05	0,19±0,01	0,61±0,04	1,48±0,09	0,73±0,04
8	11-эйкозеновая кислота ($C_{20:1}$)	0,10±0,01	0,24±0,02	0,12±0,01	-	0,10±0,01

Примечание: рассчитанные значения представлены при $n=3$

В первом образце масла ч. посевной («Egyptian Black Seed Oil», Египет) доминируют линолевая кислота ($C_{18:2}$) – 64,08±0,61 %, олеиновая кислота ($C_{18:1}$) – 23,32±0,33 %, пальмитиновая кислота ($C_{16:0}$) – 9,26±0,54 %. Не обнаружены линоленовая ($C_{18:3}$) и бегеновая ($C_{22:0}$) кислоты,

идентифицируемые в других образцах тмина (№2 и №3), но выявлено наличие пентадециловой кислоты ($C_{15:0}$), и, в отличие от остальных образцов масел, выявлено присутствие гептадеценовой кислоты ($C_{17:1}$) в минорном количестве [49] (рис. 42).

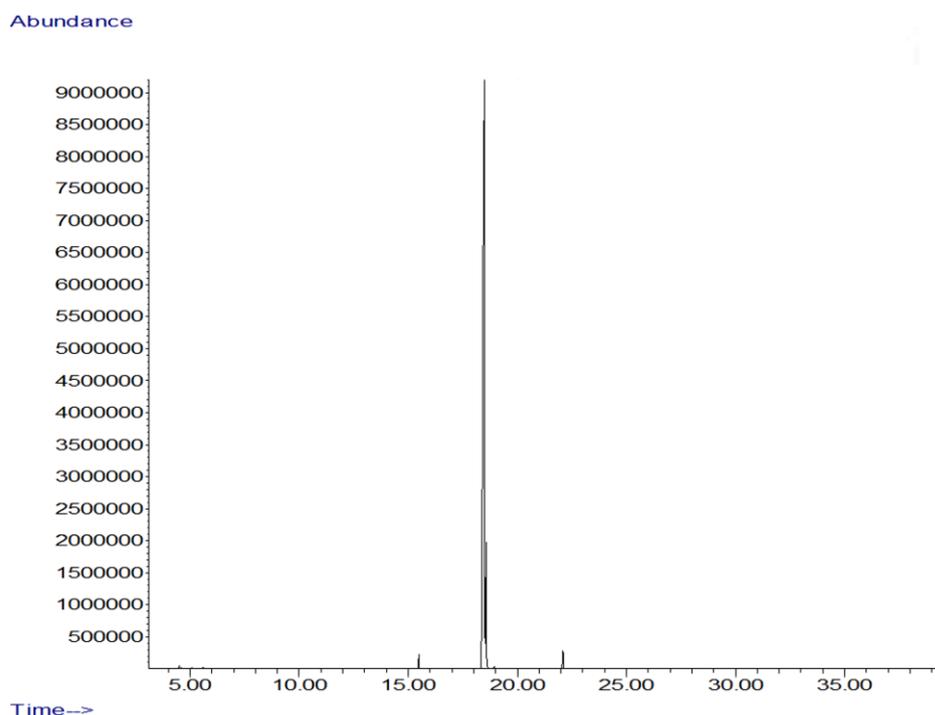


Рисунок 42 – Хроматограмма масла чернушки посевной №1 «Egyptian Black Seed Oil» (Египет)

Во втором образце масла ч. посевной «Масло Королевское» («Хаббет Барака», Египет) выявлено принципиально отличное от других образцов соотношение линолевой кислоты ($C_{18:2}$) и олеиновой кислоты ($C_{18:1}$): линолевой ($C_{18:2}$) – $36,64 \pm 0,42$ %, олеиновой ($C_{18:1}$) – $55,84 \pm 0,58$ % и меньшее содержание пальмитиновой кислоты ($C_{16:0}$) – $3,97 \pm 0,26$ %. Отсутствует 11-октадеценовая (вакценовая) кислота ($C_{18:1}$) [49] (см. приложения №3 и №4).

Образцы №3-5 весьма схожи по жирнокислотному составу: в 3-ем «Black seeds oil» (Немани, Пакистан) содержание линолевой кислоты ($C_{18:2}$) – $63,33 \pm 0,57$ %, олеиновой кислоты ($C_{18:1}$) – $26,56 \pm 0,34$ %, пальмитиновой кислоты ($C_{16:0}$) – $6,41 \pm 0,43$ %; в 4-ом образце «Huile de Nigelle» (Саудовская Аравия) не обнаруживается пальмитоолеиновая ($C_{16:1}$) и маргариновая ($C_{17:0}$), линоленовая ($C_{18:3}$), 11-эйкозеновая ($C_{20:1}$), арахидиновая ($C_{20:0}$), бегеновая ($C_{22:0}$)

кислоты, содержание линолевой кислоты ($C_{18:2}$) – $48,92 \pm 0,54$ %, олеиновой кислоты ($C_{18:1}$) – $31,53 \pm 0,42$ %, пальмитиновой кислоты ($C_{16:0}$) – $12,36 \pm 0,62$ %; в 5-ом образце «Золото Эфиопии» (Египет) не установлено наличие линоленовой кислоты ($C_{18:3}$) кислоты, содержание линолевой кислоты ($C_{18:2}$) – $64,82 \pm 0,62$ %, олеиновой кислоты ($C_{18:1}$) – $24,09 \pm 0,33$ % [49] (см. приложения №3 и №4).

Во всех образцах масел присутствуют в минорном количестве эйкозодиеновая ($C_{20:2}$) кислота (от 0,5% до 1,5%), но ввиду низкого содержания не может быть рекомендована в качестве критерия идентификации масла [49].

Кроме того, идентификация масел на содержание растворенных в них компонентов эфирного масла показала их минорность по отношению к другим компонентам масла ч. посевной (жирным кислотам и их триглицеридам). Фракция эфирного масла в основном представлена *n*-цимолем, который доминирует по содержанию для всех проб масла (0,09-0,85%). Низкое содержание наблюдалось для β -туйона (0,03-0,07%), лонгифолена (0,03-0,08%), а также для α -пинена и *транс*-4-метокситуйона, которые были обнаружены в меньшем количестве во всех образцах жирных масел. В следовых количествах содержатся β -пинен, тимохинон, сабинен, лимонен, γ -терпинен, *цис*-4-метокситуйон, терпинен-4-ол, камфора, борнилацетат, лонгипинен и апиол [49].

Таким образом, основной профиль жирных кислот масла ч. посевной формируют ненасыщенные кислоты – линолевая ($C_{18:2}$) (49-65 %), олеиновая ($C_{18:1}$) (23-32 %), эйкозодиеновая ($C_{20:2}$) (0,5-1,5 %), насыщенные кислоты – пальмитиновая ($C_{16:0}$) (6-12 %), стеариновая ($C_{18:0}$) (1,3-2,7%) [49].

Полученные результаты сравнительного жирнокислотного состава масел ч. посевной сопоставимы с литературными данными по составу масел чёрного тмина, которые представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Сравнительный анализ жирнокислотного состава масел чёрного тмина с литературными данными

Основной жирнокислотный профиль	Страны			
	Турция [182]	Германия [169]	Марокко [126]	Россия, Татарстан [9]
Линолевая кислота (C _{18:2})	57,0%	57,3%	58,5%	60,6%
Олеиновая кислота (C _{18:1})	22,8%	24,1%	23,8%	23,3%
Пальмитиновая кислота (C _{16:0})	12,5%	13,0%	13,1%	10,0%
Стеариновая кислота (C _{18:0})	3,1%	3,2%	2,3%	2,4%
Эйкозодиеновая кислота (C _{20:2})	-	2,44%	-	2,5%
11 - эйкозеновая кислота (C _{20:1})	0,25%	0,3%	-	-

Сопоставление полученных нами результатов и литературных данных по количественному содержанию жирных кислот позволяют рекомендовать в качестве критериев качества масла ч. посевной следующий характерный жирнокислотный профиль: линолевой кислоты – 48,0%-65,0%, олеиновой кислоты – 23,0-32,0%, пальмитиновой кислоты – 6,0%-13,0%, стеариновой кислоты- 1,3%-2,7%, эйкозодиеновой кислоты - 0,5%-2,5% (от общего содержания в жирном масле ч. посевной).

Данный метод анализа с заданными хроматографическими параметрами можно рекомендовать для целей подтверждения подлинности масла ч. посевной и как критерий доброкачественности жирного масла.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Разработаны методики качественного определения флавоноидов в траве чернушки посевной с помощью различных методов: химических реакций со специфическими реактивами на фенольные соединения (3% раствор алюминия (III) хлорида и другие), ТСХ-анализа в системе растворителей «хлороформ : этанол : вода» (25:18:2) с веществами-свидетелями – стандартными образцами рутина и никотифлорина, прямой и дифференциальной УФ-спектрофотометрии.
2. Определены характерные максимумы поглощения извлечений травы чернушки посевной: при прямой спектрофотометрии - $\lambda_{max1} = 266 \pm 2$ нм и $\lambda_{max2} = 340 \pm 2$ нм, при добавлении 3% спиртового раствора $AlCl_3$ - $\lambda_{max1} = 275 \pm 2$ нм, $\lambda_{max2} = 340 \pm 2$ нм и $\lambda_{max3} = 408 \pm 2$ нм, в дифференциальном варианте – при $\lambda_{max} = 410 \pm 2$ нм (что соответствует максимуму раствора СО рутина).
3. Разработана методика определения количественного содержания флавоноидов в траве *Nigella sativa* L. методом дифференциальной спектрофотометрии при $\lambda_{max} = 412$ нм (в пересчете на рутин). Относительная погрешность единичного определения суммы флавоноидов в траве ч. посевной по данной методике составляет $\pm 13,82\%$, а относительная погрешность определения среднего значения составляет $4,17\%$ (при доверительной вероятности 95%). Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин варьирует в зависимости от географического расположения и условий произрастания от $1,17 \pm 0,16\%$ до $1,71 \pm 0,22\%$ (в стадии цветения $2,0\%$).
4. Проанализирован процесс накопления суммы флавоноидов в траве чернушки посевной. Отмечается плавное снижения уровня суммы флавоноидов по мере вегетационного развития побега. Однако в рамках рационального и комплексного использования всего растения чернушки посевной, а именно семян и травы ч. посевной, рекомендуется

проводить сбор травы одновременно с семенами (до пожелтения травы) в фазе активного плодоношения в августе.

5. Изучены и предложены методики качественного и количественного анализа и числовые показатели в проект ФС на новый вид ЛРС «Чернушки посевной трава». Введен числовой показатель содержания рутина - не менее 1,0 %.
6. Установлен методом ГХ-МС и рекомендован в качестве критерия оценки доброкачественности масел чернушки посевной характерный жирнокислотный профиль: линолевой кислоты – 48,0%-65,0%, олеиновой кислоты – 23,0-32,0%, пальмитиновой кислоты – 6,0%-13,0%, стеариновой кислоты- 1,3%-2,7%, эйкозодиеновой кислоты - 0,5%-2,5%.

ГЛАВА 6. ОБОСНОВАНИЕ ПЕРСПЕКТИВНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МЕДИЦИНСКОЙ ПРАКТИКЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ НА ОСНОВЕ ТРАВЫ И МАСЛА ЧЕРНУШКИ ПОСЕВНОЙ (*NIGELLA SATIVA* L.)

Создание и использование новых перспективных лекарственных средств на основе ЛРС были и остаются актуальными задачами отечественной фармации, в т.ч. в области создания новых антимикробных и противогрибковых препаратов [20, 26, 27, 30, 75, 40].

Рациональная фармакотерапия должна включать обоснованное сочетание как синтетических средств, обладающих сильно выраженными терапевтическими свойствами, с природными ЛС и сборами, сочетающими мягкое лечебное, лечебно-профилактическое действие и нивелирование побочных действий, что обеспечит комплексное лечение [20, 30, 37].

В настоящее время увеличение антимикробной резистентности представляет собой серьезную опасность, которая заключается в снижении эффективности мероприятий по профилактике и лечению инфекционных заболеваний человека [118, 146, 187]. С учетом известного спектра антимикробной и противогрибковой активности масла ч. посевной в настоящей работе с позиции комплексной переработки сырья проведено изучение антимикробных и противогрибковых свойств водно-спиртовых извлечений и настойки на основе травы ч. посевной. Это расширяет спектр представлений о фармакологической активности ч. посевной и возможности использования растения при создании отечественных препаратов, применяемых в антибактериальной (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) и противогрибковой (*Candida albicans*) терапии.

Кроме того, с целью поиска перспективных антиоксидантных средств для масел ч. посевной с доказанным высоким содержанием непредельных жирных кислот проведено сравнительное исследование антиоксидантной активности образцов жирного масла методом регистрации хемиллюминесценции в модельных системах (МС) *in vitro*.

6.1. Изучение антимикробной и противогрибковой активности водно-спиртовых извлечений и настойки травы чернушки посевной

Для объективной оценки антимикробной и противогрибковой активности изучаемого сырья был проведен анализ водно-спиртовых извлечений с определением минимальной ингибирующей концентрации (МИК) в отношении основных клинически значимых штаммов микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*) [51]. Также проведено сопоставление активности с препаратом сравнения – настойкой эвкалипта, для которой доказаны антимикробные свойства, в том числе против MRS-штаммов [154, 183]. Определение МИК проводили методом двойных серийных разведений в бульоне (см. 2.2.6. Фармакологические методы исследования).

Проведение анализа антимикробной активности водно-спиртовых извлечений из травы чернушки посевной, в также их сравнение с настойкой эвкалипта (препарат сравнения) позволило получить следующие данные [51].

При тестировании 40% водно-спиртового извлечения (1:30) травы чернушки посевной наблюдалась антимикробная и противогрибковая активность в отношении штаммов *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* при четырехкратном разведении, а также в отношении микроорганизмов *P. aeruginosa* при восьмикратном разведении (табл. 20). При сравнении 40% водно-спиртового извлечения с «отрицательным» стандартом (минимальной подавляющей концентрацией для 40% спирта этилового) наблюдалось небольшое различие антимикробной и противогрибковой активности между исследуемым образцом и «отрицательным» стандартом, который проявил чуть большую активность в отношении *E. coli* и *C. albicans* (табл. 21). Данный факт позволяет утверждать отсутствие существенного вклада имеющегося в экстракте комплекса биологически активных соединений в фармакологический эффект при данной концентрации извлечения [51].

Таблица 20 – Анализ антимикробной и противогрибковой активности извлечений и настойки травы *Nigella sativa* L.

Объект/ Микроорганизм	Кратность разведения*						
	1	2	3	4	5	6	7
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
<i>Staphylococcus aureus</i>							
Извлечение на 40% спирте	–	–	+	+	+	+	+
Извлечение на 70% спирте	–	–	–	+	+	+	+
Извлечение на 96% спирте	–	–	–	+	+	+	+
Настойка травы чернушки на 70% спирте	–	–	+	+	+	+	+
Настойка эвкалипта на 70% спирте	–	–	–	–	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>							
Извлечение на 40% спирте	–	–	+	+	+	+	+
Извлечение на 70% спирте	–	–	–	+	+	+	+
Извлечение на 96% спирте	–	–	–	+	+	+	+
Настойка травы чернушки на 70% спирте	–	–	–	–	+	+	+
Настойка эвкалипта на 70% спирте	–	–	–	–	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
Извлечение на 40% спирте	–	–	–	+	+	+	+
Извлечение на 70% спирте	–	–	–	–	+	+	+
Извлечение на 96% спирте	–	–	–	–	+	+	+
Настойка травы чернушки на 70% спирте	–	–	–	–	+	+	+
Настойка эвкалипта на 70% спирте	–	–	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>							
Извлечение на 40% спирте	–	–	+	+	+	+	+
Извлечение на 70% спирте	–	–	–	+	+	+	+
Извлечение на 96% спирте	–	–	–	+	+	+	+
Настойка травы чернушки на 70% спирте	–	–	–	–	+	+	+
Настойка эвкалипта на 70% спирте	–	–	–	+	+	+	+

Примечание: + наличие роста микроорганизма; – отсутствие роста микроорганизма.

Таблица 21 – Минимальные ингибирующие рост штаммов концентрации спирта этилового («отрицательный» контроль)

Объект/ Микроорганизм	Кратность разведения*						
	1	2	3	4	5	6	7
	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128
<i>Staphylococcus aureus</i>							
Спирт этиловый 40%	–	–	+	+	+	+	+
Спирт этиловый 70%	–	–	–	+	+	+	+
Спирт этиловый 96%	–	–	–	+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>							
Спирт этиловый 40%	–	–	–	+	+	+	+
Спирт этиловый 70%	–	–	–	+	+	+	+
Спирт этиловый 96%	–	–	–	+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>							
Спирт этиловый 40%	–	–	+	+	+	+	+
Спирт этиловый 70%	–	–	–	+	+	+	+
Спирт этиловый 96%	–	–	–	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>							
Спирт этиловый 40%	–	–	–	+	+	+	+
Спирт этиловый 70%	–	–	–	+	+	+	+
Спирт этиловый 96%	–	–	–	+	+	+	+

Примечание: + наличие роста микроорганизма; – отсутствие роста микроорганизма.

Для 70% водно-спиртового извлечения (1:30) травы чернушки антимикробная и противогрибковая активность была выраженной в отношении *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* в восьмикратном разведении; в отношении *P. aeruginosa* – при разведении в 16 раз (табл. 20) [51]. При сравнении с «отрицательным» стандартом спирта этилового в концентрации

70% отмечается усиление антимикробных свойств и подавление роста микроорганизмов *P. aeruginosa* (табл. 20; табл. 21) [51].

Водно-спиртовое извлечение на 96% спирте (1:30) травы чернушки показало аналогичную антимикробную и противогрибковую активность с 70% водно-спиртового извлечением: в отношении *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* – при разведении в 8 раз, в отношении к *P. aeruginosa* – при разведении в 16 раз [51]. При сравнении с «отрицательным» стандартом спирта этилового в концентрации 96% отмечается усиление антимикробных свойств и подавление роста микроорганизмов *P. aeruginosa*. Соответственно, для концентраций 70% и 96% водно-спиртовых извлечений травы чернушки посевной отмечается значительное подавление роста микроорганизмов *P. aeruginosa* (табл. 20; табл. 21) [51].

В процессе проведенного скринингового анализа антимикробной активности водно-спиртовых извлечений травы чернушки посевной были определены условия получения лекарственной формы – настойки [51]. В качестве экстрагента для изготовления настойки травы чернушки посевной была выбрана 70% концентрация спирта этилового, поскольку данная концентрация является оптимальными экстрагентом для данного сырья, содержащего комплекс биологически активных веществ группы флавоноидов и при данных параметрах экстракции отмечается наибольший антимикробный эффект в отношении изучаемых штаммов микроорганизмов, в особенности штамма *P. aeruginosa* [51]. Настойка травы чернушки посевной была получена на спирте этиловом 70% в соотношении «сырье – экстрагент» (1:5) методом дробной мацерации с включением заключительной термической стадии – 30 минут при температуре 70°C [51] (см. 2.2.5. Технологические методы).

Тестируемая настойка травы чернушки посевной на 70% спирте этиловом (1:5), показала следующие результаты. Схожий с извлечениями на 70% и 96% спирте этиловом антимикробный эффект наблюдался в отношении *P. aeruginosa* при разведении пробы в 16 раз, однако, кроме данного преобладающего действия усилился антимикробный эффект в отношении *E.*

coli и *C. albicans* – остановка роста до 16-кратного разведения [51]. Действие против штамма *S. aureus*, наоборот, немного снизилась – до четырёхкратного разведения (рис. 43).

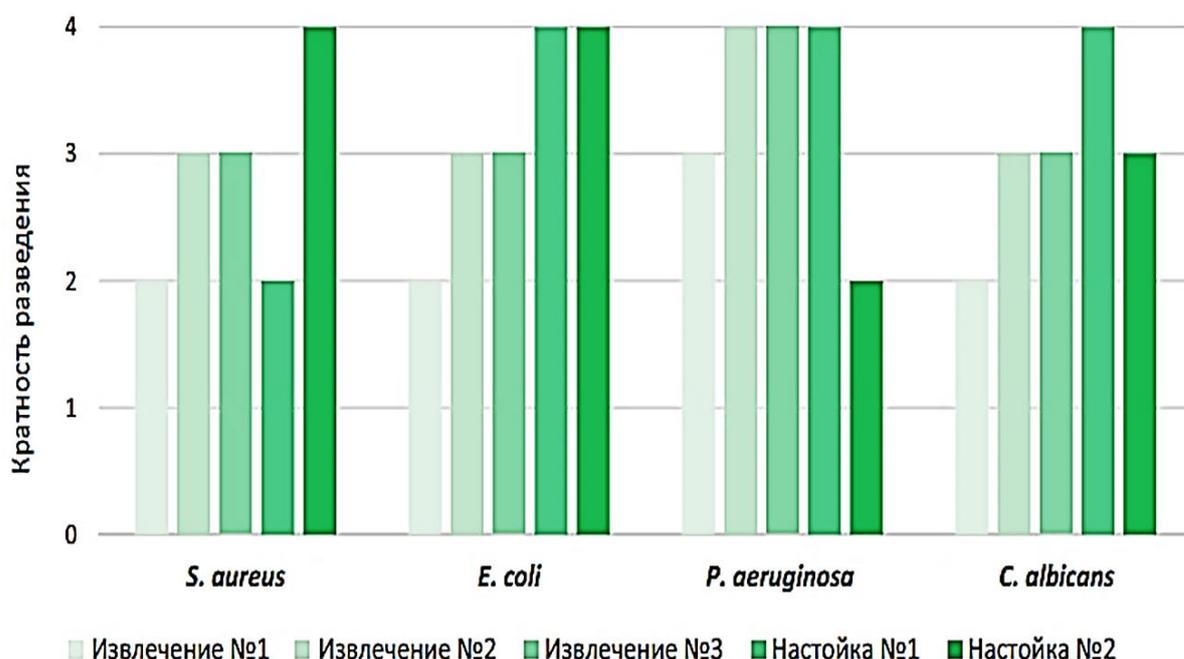


Рисунок 43 – Сравнительная диаграмма антибактериальной и противогрибковой активности спиртовых извлечений и настойки травы *Nigella sativa* L. (по оси абсцисс – порядковый номер разведения, при n=3)
 Обозначения: извлечение №1- на 40 % спирте; извлечение №2- на 70 % спирте; извлечение №3- на 96 % спирте;
 настойка №1 – настойка травы чернушки посевной;
 настойка №2 – настойка эвкалипта

Препарат сравнения – настойка эвкалипта, показывает высокую активность в отношении *S. aureus* и *E. coli* – замедление роста микроорганизмов при разведении в 16 раз [51]. Однако в отношении *P. aeruginosa* и *C. albicans* имеет слабую активность в сравнении с тестируемым препаратом - 4-ёх и 8-кратное разведение против 16-кратного у настойки травы чернушки посевной (рис. 43).

Полученные данные показывают перспективную для использования антимикробную и противогрибковую активность экстракционного препарата «Чернушки травы настойка» из травы ч. посевной (*Nigella sativa* L.). Настойка чернушки на 70% спирте этиловом (1:5) имеет специфическую направленность против штаммов *P. aeruginosa* и *C. albicans*, которая выше

антимикробной и противогрибковой активности настойки эвкалипта, используемой в медицинской практике. Данный факт может служить основанием для создания новых антибактериальных и противогрибковых препаратов на основе травы ч. посевной, в том числе в рамках концепции комплексного и безотходного производства.

6.2. Изучение безопасности настойки травы чернушки посевной

Одним из основных критериев оценки безопасности разрабатываемых лекарственных препаратов является определение острой токсичности. Исследование острой токсичности проводилось для разработанного препарата «Чернушки травы настойка» на двух группах лабораторных крыс, эксперимент проводился в течение двух недель (см. 2.2.6. *Фармакологические методы исследования*).

За время эксперимента летальных исходов зафиксировано не было, также на протяжении всего исследования вес крыс экспериментальной группы и вес крыс контрольной группы практически не отличался.

Таким образом, препарат «Чернушки травы настойка» в соответствии с государственными требованиями к безопасности [10, 12] относится к III классу токсичности (умеренно опасные вещества) как спиртосодержащий экстракционный препарат.

6.3. Изучение антиоксидантной активности жирного масла чернушки посевной

Антиоксиданты, способные инактивировать свободные радикалы с образованием неактивных или менее активных форм, играют важную роль в регуляции протекания свободнорадикальных реакций (СРО) в организме и существенно влияют на его состояние [41, 59]. В многочисленных исследованиях, проведенных как *in vitro*, так и *in vivo*, было показано положительное влияние различных химических классов веществ-антиоксидантов на течение большого числа заболеваний, в том числе

инфекционно-воспалительных, сердечно-сосудистых, онкологических, диабета и ряда других [4, 117, 134, 143].

Оценка антиоксидантных свойств различных соединений является крайне актуальной задачей. Однако при всей вариабельности методических подходов стандартизованного метода оценки антиокислительной активности не существует [84].

Учитывая большое количество обнаруженных эссенциальных жирных кислот, было проведено измерение антиоксидантной активности жирных масел чернушки посевной в модельных системах (МС), моделирующих процессы выработки АФК и ПОЛ, методом регистрации хемилюминесценции [49]. В качестве образцов контроля и препарата-сравнения служили физиологический раствор и раствор альфа-токоферола ацетата, соответственно (см. 2.2.6. *Фармакологические методы исследования*).

С использованием данного метода установлено существенное ингибирующее влияние исследуемых образцов масел ч. посевной на кинетику свободнорадикального окисления в системах АФК и ПОЛ [49].

При добавлении в модельную систему, где генерировались АФК, образцов масел ч. посевной уменьшалась амплитуда быстрой вспышки, удлинялся латентный период, медленная вспышка начиналась позже и угасала раньше, значение максимальной светимости снижалось. Определены образцы с наилучшими (рис. 44) и наименьшими показателями (рис. 45).

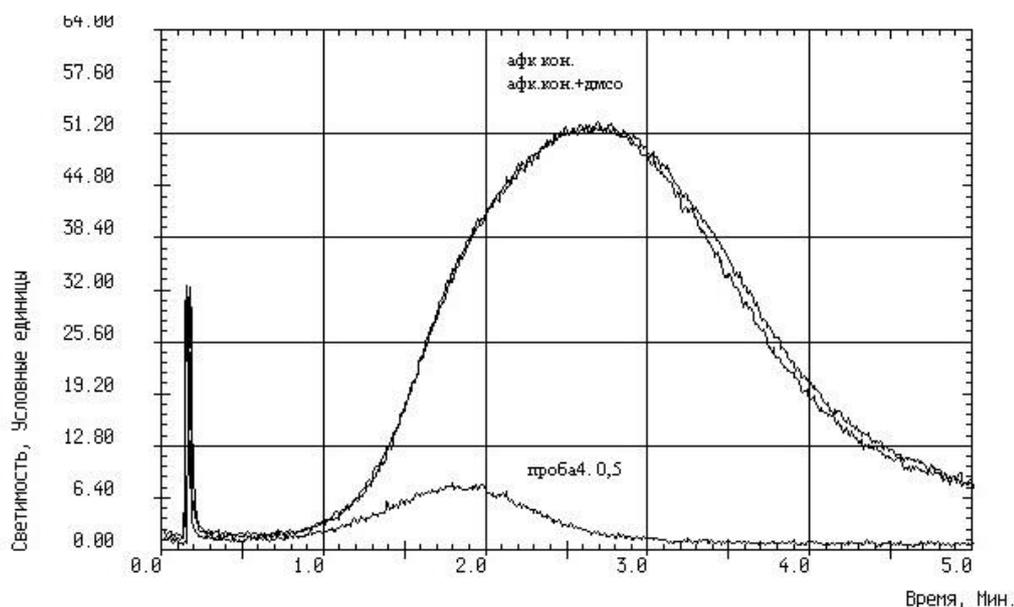


Рисунок 44 – Влияние образца масла чернушки посевной (Саудовская Аравия) на процессы СРО в модельной системе АФК

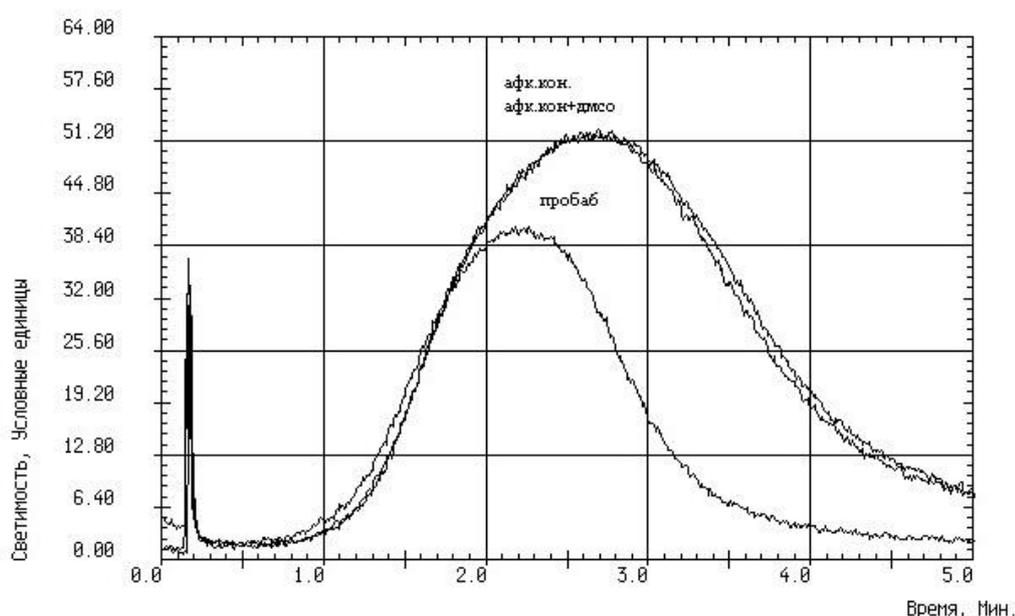


Рисунок 45 – Влияние образца масла чернушки посевной (Россия) на процессы СРО в модельной системе АФК

Показательная характеристика хемилюминесценции – светосумма свечения, была меньшей по сравнению с контролем, контроль+ДМСО и препаратом сравнения (альфа-токоферола ацетатом) во всех 6 образцах изучаемых масел ч. посевной [49] (табл. 22). В таблице 22 приведены данные о влиянии жирных масел ч. посевной на хемилюминесценцию модельных систем АФК. Угнетение ХЛ зависело от концентрации жирных масел в МС. На примере 1-го образца масла было выбрано оптимальным для данного

анализа взятие пробы в 0,5 мл раствора (5 мг/мл в МС), а проба в 0,1 мл раствора (1 мг/мл в МС) имела сравнительное значение, так как положительное влияние на уменьшение СРО было недостаточным [49]. Выявлено: чем больше концентрация масла в МС, тем сильнее подавлялось свечение, что свидетельствовало о дозозависимом эффекте исследуемых образцов [49].

Таблица 22 – Сравнительный анализ влияния жирных масел ч. посевной на хемилюминесценцию в МС, генерирующей АФК

№	Опыт	Объем, мл	Светосумма абсол/относит. контроля	Макс. светимость
1	Контроль	0,5	123±0,2/102,5%	52±0,2
2	Контроль+ДМСО	0,5	120±0,1/100%	51±0,1
3	Масло чёрного тмина «Egyptian Black Seed Oil» («Organic CO. for Natural oil», Египет)	0,1 0,5	110±0,2/91,7% 18±0,1/15%	52±0,2 11±0,1
4	Масло чёрного тмина «Масло Королевское» («Хаббет Барака», Египет)	0,5	31±0,2/25,8%	20±0,2
5	Масло чёрного тмина «Black seeds oil» («Немані», Пакистан)	0,5	26±0,2/21,7%	17±0,2
6	Масло чёрного тмина «Huile de Nigelle» («Современник красоты», Саудовская Аравия)	0,5	13±0,1/10,8%	8±0,1
7	Масло чёрного тмина «Золото Эфиопии», («Arabian secrets», Египет, провинция Гиза)	0,5	17±0,1/14,2%	10±0,1
8	Масло чёрного тмина нерафинированное (ООО «Oleos», Россия)	0,5	69±0,2/57,5%	40±0,2
9	Препарат сравнения (масляный раствор альфа-токоферола ацетата)	0,5	115±0,3/95,8%	50±0,3

Препарат сравнения (масляный раствор альфа-токоферола ацетата) незначительно удлинял латентный период и уменьшал величину светосуммы ХЛ. Исследуемые жирные масла ч. посевной значительно удлиняют латентный период и в среднем в 5,5 раз активнее уменьшают величину

светосуммы ХЛ, чем препарат сравнения (не учитывая образец российского производства) [49].

Для анализа в МС желточных липопroteидов было выбрано оптимальным взятие пробы в 0,1 мл раствора (1 мг/мл в МС), в качестве сравнения – 0,5 мл раствора, или 5 мг/мл в МС (для прослеживания дозозависимого эффекта). Наблюдалось подавление уровня свечения МС, отмечалось более выраженное уменьшение амплитуды быстрой и медленной вспышек, увеличение длительности латентного периода, снижение значений максимальной светимости [49]. Также аналогично МС АФК отмечен образец с наилучшими показателями – образец № 6 (рис. 46) и наименьшими показателями – образец №8 (рис. 47).

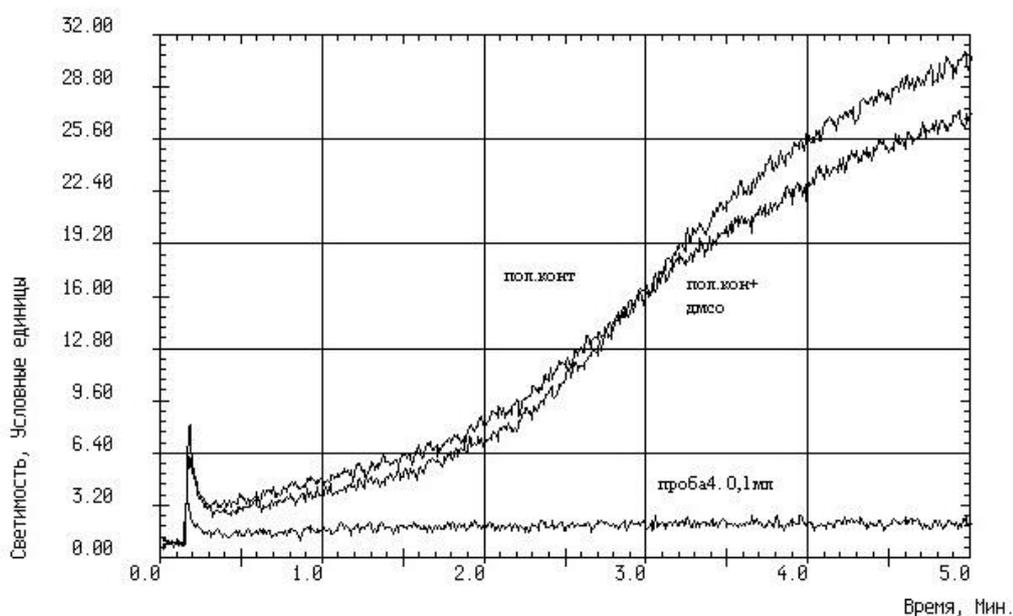


Рисунок 46 – Влияние образца масла ч. посевной (Саудовская Аравия) на процессы СРО в модельной системе ПОЛ

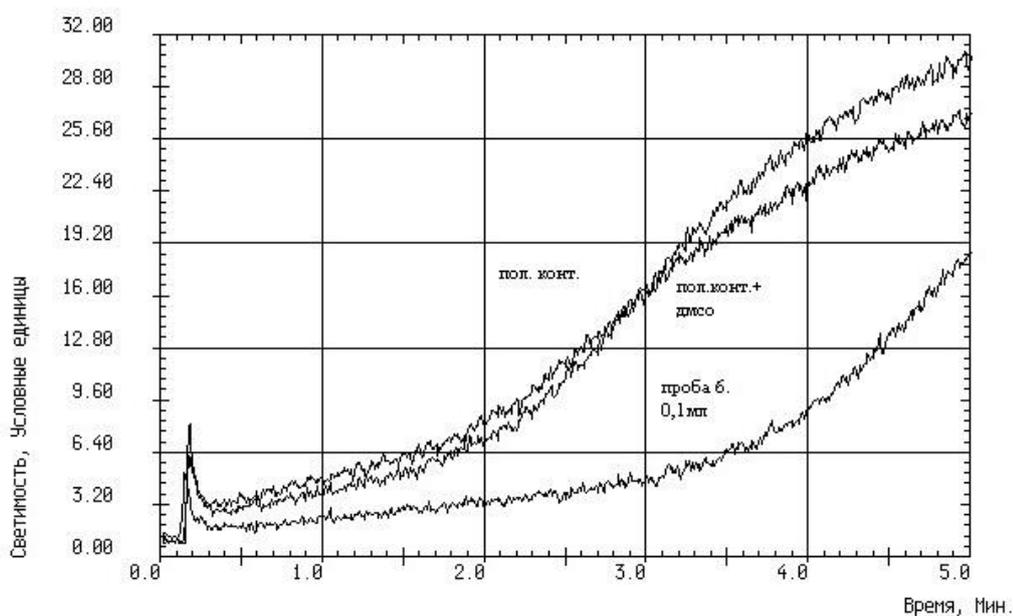


Рисунок 47 – Влияние образца масла ч. посевной (Россия) на процессы СРО в модельной системе ПОЛ

Следовательно, жирное масло ч. посевной может рассматриваться как антиоксидант перекисного окисления липидов, при этом наибольшим антиоксидантным действием обладают образцы жирных масел зарубежного производства (Саудовская Аравия, Египет, Пакистан) [49]. В таблице 23 приведены данные о влиянии жирных масел ч. посевной на ХЛ модельных систем ПОЛ.

Таблица 23 – Сравнительный анализ влияния жирных масел чернушки посевной на хемиллюминесценцию в МС, генерирующей ПОЛ

№	Опыт	Объем, мл	Светосумма абсол /относит. контроля	Макс. светимость
1	Контроль	0,1	69±0,1/104,5%	30±0,1
2	Контроль+ДМСО	0,1	66±0,2/100%	27±0,2
3	Масло чёрного тмина «Egyptian Black Seed Oil» («Organic CO. for Natural oil», Египет)	0,1	19±0,2/28,8%	12±0,2
		0,5	7,8±0,3/11,8%	2,7±0,3
4	Масло чёрного тмина «Масло Королевское» («Хаббет Барака», Египет)	0,1	18±0,2/27,3%	11±0,2

5	Масло чёрного тмина «Black seeds oil» («Немани», Пакистан)	0,1	20±0,2/30,3%	11±0,2
6	Масло чёрного тмина «Huile de Nigelle» («Современник красоты», Саудовская Аравия)	0,1	9±0,3/13,6%	3±0,3
7	Масло чёрного тмина «Золото Эфиопии», («Arabian secrets», Египет, провинция Гиза)	0,1	10±0,7/15,2%	4±0,4
8	Масло чёрного тмина нерафинированное (ООО «Oleos», Россия)	0,1	29±0,5/43,9%	19±0,5
9	Препарат сравнения (масляный раствор альфа-токоферола ацетата)	0,1	33±0,2/50,0%	20±0,2

Таким образом, полученные данные показывают перспективную для использования способность жирного масла ч. посевной подавлять генерацию АФК и ПОЛ в использованных модельных системах, что характеризует их антиоксидантные свойства. По величине светосуммы отмечено, что образцы масла ч. посевной (без учета образца масла из России) в среднем 5,5 раз активнее подавляют процессы СРО в системе АФК, в 2,2 раза активнее – в системе ПОЛ, чем препарат сравнения (масляный раствор альфа-токоферола ацетата) [49]. Выявлено существенное различие свойств жирных масел отечественного и зарубежного производства, что может быть связано с особенностями технологии получения жирного масла.

Полученные данные будут служить основой для дальнейшего использования жирного масла чернушки в медицинских целях.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6

1. Проведено исследование антимикробной (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) и противогрибковой (*Candida albicans*) активности в условиях *in vitro* водно-спиртовых извлечений (40%, 70%, 96% спирт этиловый) травы чернушки посевной (*Nigella sativa* L.) и установлено, что:
 - для концентраций 70% и 96% водно-спиртовых извлечений травы чернушки посевной отмечается значительное подавление роста микроорганизмов *P. aeruginosa* – до 16-кратного разведения, в отношении *S. aureus*, *E. coli* и *C. albicans* – при разведении в 8 раз;
 - для концентрации 40% водно-спиртового извлечения не отмечено существенных различий антимикробной и противогрибковой активности с «отрицательным» стандартом.
2. В процессе проведенного анализа антимикробной активности водно-спиртовых извлечений травы чернушки посевной были определены условия получения лекарственного препарата – «Чернушки травы настойка» (1:5), для которой была выбран 70% спирт этиловый как оптимальный экстрагент, что в итоге обеспечивает наибольший антимикробный и противогрибковый эффект в отношении изучаемых штаммов микроорганизмов.
3. Настойка травы чернушки показала следующие результаты по сопоставлению с активностью с препаратом-сравнения промышленного производства – настойкой эвкалипта:
 - выраженный антимикробный эффект изучаемой настойки наблюдался в отношении *P. aeruginosa* (остановка роста до 16-кратного разведения), усилился антимикробный и противогрибковый эффект в отношении *E. coli* и *C. albicans* – остановка роста также до 16-кратного разведения;
 - препарат-сравнения показал более высокую активность в отношении *S. aureus* – замедление роста микроорганизмов при разведении в 16 раз,

однако в отношении *P. aeruginosa* и *C. albicans* имеет слабую активность в сравнении с тестируемым препаратом - 4-ёх и 8-кратное, соответственно.

4. Исследование безопасности полученной настойки травы чернушки посевной на острую токсичность позволяет её отнести к III классу токсичности (умерено опасные вещества) как спиртосодержащий экстракционный препарат, что дает возможность его безопасного применения в медицинской практике при рациональном назначении.
5. Исследование сравнительных антиоксидантных свойств масел чернушки посевной в системах, моделирующих процессы выработки АФК и ПОЛ, методом регистрации хемилюминесценции *in vitro* выявило перспективную для использования в медицинских целях способность жирного масла чернушки посевной подавлять генерацию активных форм кислорода и перекисное окисление липидов:
 - образцы масла чернушки посевной по величине светосуммы в среднем в 5,5 раза активнее подавляют процессы свободнорадикального окисления в системе АФК и в 2,2 раза активнее – в системе ПОЛ чем препарат-сравнения (масляный раствор альфа-токоферола ацетата);
 - выявлено существенное различие свойств жирных масел отечественного и зарубежного производства, что может быть связано с особенностями технологии получения жирного масла.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное фармакогностическое исследование чернушки посевной (*Nigella sativa* L.) позволило сделать следующие **общие выводы**:

1. В результате морфолого-анатомического исследования травы чернушки посевной (*Nigella sativa* L.) были получены следующие результаты:
 - для цветков чернушки посевной в качестве диагностически значимых особенностей строения отмечены: двугубый нектарник с характерным опушением верхней и нижней губы; опушение поверхности завязи многоклеточными железками, и каплевидными простыми волосками, а также наличие под эпидермисом завязи слоя клеток, имеющих особую гранулярную структуру протопласта;
 - для вегетативной части побега (стебель, листья) чернушки посевной в качестве диагностически значимых особенностей строения отмечены: каплевидные двухклеточные волоски; мелкие зубцы на краю листа; U-образная форма медиальной части черешка на поперечном сечении и наличие длинных простых волосков на концах ребер;
 - вещества флавоноидной природы на микропрепаратах имеют схожее свечение: при $\lambda=360$ нм - голубое или светло-оранжевое свечение и при $\lambda=420$ нм – желтое, и локализованы в диагностически специфичных трихомах (каплевидных и длинных простых волосках, которыми покрыты основные надземные органы чернушки посевной), а также в основной паренхиме стебля.

2. Впервые из травы чернушки посевной были выделены и идентифицированы вещества с использованием хроматографических (колоночной хроматографии, ТСХ) и спектральных (ЯМР-, УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии) методов - *нигелфлавонозид G* (3-O- β -D-[α -L-O-рамнопиранозил-(1 \rightarrow 6)]-глюкопиранозид-[(2 \rightarrow 1)-O- β -D-глюкопиранозил-(2 \rightarrow 1)-O- β -D-глюкопиранозил]-3,5,6,7,4'-пентагидрокси-3'-метоксифлавона), который является новым природным соединением, и *даукостерин* (3-O- β -D-глюкопиранозид β -ситостерина). Впервые в РФ из травы чернушки

посевной выделены и идентифицированы вещества - *никотифлорин* (3-О-β-D-глюкопиранозид кемпферола), *рутин* и *β-ситостерин*.

3. Обоснована целесообразность определения никотифлорина и рутина методом ТСХ для травы чернушки посевной с использованием в качестве веществ-свидетелей стандартных образцов рутина и никотифлорина. Определены характерные максимумы поглощения в диапазоне УФ- и видимого излучения извлечений на 70% спирте этиловом травы чернушки посевной: при прямой спектрофотометрии - 266 ± 2 нм и 340 ± 2 нм, при добавлении 3% спиртового раствора $AlCl_3$ - 275 ± 2 нм, 340 ± 2 нм и 408 ± 2 нм, в дифференциальном варианте – при 410 ± 2 нм.

4. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в траве чернушки посевной в пересчете на рутин методом дифференциальной спектрофотометрии при 412 нм. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин варьирует в зависимости от географического расположения и условий произрастания от $1,17 \pm 0,16$ % (Самарская область) до $1,71 \pm 0,22$ % (Ульяновская область). Установлен числовой показатель содержания флавоноидов в пересчете на рутин в траве чернушки посевной – не менее 1,0 %.

5. Установлены и рекомендованы критерии оценки доброкачественности жирных масел чернушки посевной в ходе сравнительного исследования масел методом газовой хромато-масс-спектрометрии: линолевой кислоты ($C_{18:2}$) – 48,0-65,0 %, олеиновой кислоты ($C_{18:1}$) – 23,0-32,0 %, пальмитиновой кислоты ($C_{16:0}$) – 6,0-13,0 %, стеариновой кислоты ($C_{18:0}$) – 1,3-2,7 %, эйкозодиеновой кислоты ($C_{20:2}$) – 0,5-2,5 %.

6. Проведено исследование антимикробной (в отношении *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) и противогрибковой (в отношении *Candida albicans*) активности в условиях *in vitro* водно-спиртовых извлечений и предложенной настойки из травы чернушки посевной, для которой установлены противомикробный и противогрибковый эффекты в отношении *P. aeruginosa*, *E. coli* и *C. albicans* –

ингибирование роста штаммов до 16-кратного разведения. Определен III класс токсичности (умеренно опасные вещества) для настойки из травы чернушки посевной.

7. Проведено сравнительное исследование антиоксидантных свойств масел чернушки посевной в модельных системах, моделирующих процессы выработки активных форм кислорода и перекисного окисления липидов методом регистрации хемилюминесценции *in vitro*, в ходе которого было выявлено: масла чернушки посевной по величине светосуммы в среднем в 5,5 раза активнее подавляют процессы свободнорадикального окисления в системе АФК и в 2,2 раза активнее – в системе ПОЛ чем препарат-сравнения (масляный раствор альфа-токоферола ацетата).

8. Разработан проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Чернушки посевной трава» с учетом перспектив комплексной переработки чернушки посевной.

Практические рекомендации. Разработанные в ходе диссертационной работы подходы к стандартизации сырья – травы и жирного масла семян чернушки посевной, - служат объективной и качественной оценке указанных объектов и решают вопросы их идентификации. Проект фармакопейной статьи «Чернушки посевной трава» рекомендуется для включения в ГФ РФ. Результаты, полученные в ходе диссертационного исследования, могут быть использованы в центрах сертификации и контроля качества ЛС и на фармацевтических предприятиях, а также в учебном процессе по дисциплинам «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия».

Перспективы дальнейшей разработки темы. Проведение диссертационной работы имеет научно-практическое значение для реализации задач как фармакогностического, так и в целом фармацевтического анализа, для последующего внедрения перспективных представителей рода Чернушка в фармацевтическую практику, а также для дальнейшей разработки унифицированных и научно-обоснованных подходов к стандартизации других видов ЛРС и разработке новых ЛП.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ал-Карнаки, И.М. Черный тмин. Профилактика, лечение заболеваний / И.М. Ал-Карнаки. – Изд-во: Диля, 2013. – 96 с.
2. Барыкина, И. П. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. Учебное пособие / И. П. Барыкина, Т. Д. Веселова, А. Г. Девятков. – Москва: Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 2004. – 312 с.
3. Большой энциклопедический словарь лекарственных растений: учебное пособие / под ред. Г.П. Яковлева. – 3-е изд., испр. и доп. – Санкт-Петербург: СпецЛит, 2015. – 759 с.
4. Васильев, А.Н. Противовирусная активность антиоксидантов и их комбинаций с интерфероном альфа-2b человеческим рекомбинантным в отношении вируса гриппа птиц А/Н5N1 / А.Н. Васильев, П.Г. Дерябин, Г.А. Галегов // Цитокины и воспаление. – 2011. – №2(10). – С. 32–37.
5. Васюков, В.М. Культивируемые растения Пензенской области / В.М. Васюков, Р.Р. Канеев // Изучение флоры Восточной Европы: достижения и перспективы: тез. докл. Междунар. конф. 23-28 мая 2005 г. – М., СПб.: Товарищество научных изданий КМК, 2005. – С. 16-17.
6. Владимиров, Ю. А. Свободные радикалы и антиоксиданты / Ю.А. Владимиров // Вестник РАМН. – 1998. – № 7. – С. 43-51.
7. Воронин, А.В. Использование компьютерной программы «ChemMetr 1.0» для метрологической оценки методик фармацевтического анализа / А. В. Воронин, И. В. Сынбулатов. — Текст : непосредственный // Национальная ассоциация ученых. — 2020. — Вып. 52, Т. 3. — С. 45-49.
8. Гармонов, С. Ю. Контроль качества и безопасность лекарственных препаратов : Учебное пособие / С. Ю. Гармонов, Н. С. Шитова, Л. М. Юсупова. – Казань : Казанский национальный исследовательский технологический университет, 2008. – 171 с.
9. Горяинов, С.В. Результаты сравнительного исследования состава масел семян *Nigella Sativa* L. / С.В. Горяинов, А.В. Хромов, Г. Бакуреза, Э. Сесар,

В.А. Ивлев, А.Н. Воробьев, Р.А. Абрамович, О.Г. Потанина, О.О. Новиков // Фармация и фармакология. – 2020. – №1(8). – С. 29-39.

10. ГОСТ 12.1.007-76. Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности (с изменениями). – Введ. 1977-01-01. – М.: Стандартинформ, 2007. – 7 с.

11. ГОСТ 31665-2012 Масла растительные и жиры животные. Получение метиловых эфиров жирных кислот. – Введ. 2014-01-01. – М.: Стандартинформ, 2013. – 12 с.

12. Государственная Фармакопея Российской Федерации. - Четырнадцатое издание. – М.: Министерство здравоохранения РФ, 2018. / URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php>

13. Губанов, И.А. Лекарственные растения: научное издание / И.А. Губанов. – М.: Изд-во Моск. ун-та, 1993. – 272 с.

14. Гукетлова, О.М. Определение основных показателей масла черного тмина / О.М. Гукетлова, С.П. Лукашук // Успехи современного естествознания. – 2014. – № 8. – С. 17-18.

15. Давитаян, Н.А. Разработка методики количественного определения тимохинона в семенах чернушки посевной / Н.А. Давитаян, Н.К. Рудь, Ю.Ф. Якуба, А.М. Сампиев // Кубанский научный медицинский вестник. – 2015. – № 2. – С. 56-62.

16. Дейл, З. Жидкостная колоночная хроматография (пер. с англ.) / З. Дейла, К. Мацека, Я. Янака // Под ред. докт. Хим. Наук, профессора В.Г. Березкина. – М.: Мир. – 1978. – 544 с.

17. Дикорастущие полезные растения России / под ред. А.Л. Буданцева, Е.Е. Лесиовской. – СПб.: СПХФА, 2001. – С. 465-466.

18. Жарінов В.І. Вирощування лікарських, ефіро-олійних, пряносмакових рослин / В.І. Жарінов, А.І. Остапенко. – Київ: Вища школа, 1994. – 234 с

19. Зацепина, Е.Е. Адаптирующий эффект экстракта масла чернушки дамасской / Е.Е. Зацепина, М.Н. Ивашев, Е.Э. Задорожная // Международный

журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2013. – №7. – С. 133-134.

20. Зилфикаров, И. Н. Природные лекарственные препараты: химический анализ и стандартизация : справочное и научно-практическое издание / И. Н. Зилфикаров. – Москва : СЛОН ПО, 2021. – 712 с

21. Золотницкая, С.Я. Лекарственные ресурсы флоры Армении / С.Я. Золотницкая. – Ер.: Изд-во АН АрССР, 1965. – Т. 2. – 371 с.

22. Золотницкая, С.Я. Лекарственные ресурсы флоры Армении / С.Я. Золотницкая. – Ер.: Авторское издание, 2014. – Т. 2. – С. 30-31.

23. Исакова, А.Л. Фенология развития генотипов рода чернушка (*Nigella*) в условиях северо-востока Беларуси / А.Л. Исакова, В.Н. Прохоров // Лекарственные растения: биоразнообразие, технологии применения: сборник научных статей по материалам I Международной научно-практической конференции. – Гродно: ГГАУ. – 2014. – С. 32–35.

24. Исакова, А.Л. Посевные качества семян нигеллы / А.Л. Исакова, В.Н. Прохоров // Современные технологии сельскохозяйственного производства : сборник научных статей по материалам XVIII Международной научно-практической конференции. – Гродно: ГГАУ. – 2015. – С. 46–48.

25. Караматов, И.Д. Чернушка посевная как лечебное средство в древней, современной народной и научной медицине (обзор литературы) / И.Д. Караматов, И.У. Абдулхаков // Актуальные проблемы гуманитарных и естественных наук. – 2013. – №4. – С. 406-413.

26. Киселева, Т.Л. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества / Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова. – М.: Профессиональная ассоциация натуротерапевтов, 2009. – 295 с.

27. Киселева, Т.Л. Отечественные фармакопейные растения и сырье / Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова, А.А. Карпеев, И.А. Самылина, Е.В. Цветаева, Л.Н. Фролова, О.А. Корвякова // Учебное пособие. – М.: Издательство Профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2009. – 26 с.

28. Косман, В.М. Применение УФ-спектральных показателей окисленности в оценке доброкачественности жирных растительных масел / В.М. Косман // Масложировая промышленность, 2009. – №1. – С. 17-21.
29. Кудинов, М.А. Пряно-ароматические растения / М.А. Кудинов, Л.В. Кухарева, Г.В. Пашина, Е.В. Иванова. – Минск: Ураджай, 1986. – 159 с.
30. Куркин, В.А. Основы фитотерапии: учебное пособие / В.А. Куркин. - Самара: ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава»; ООО ОФОРТ, 2009. - С. 462-463.
31. Куркин, В.А. Производственная практика по стандартизации лекарственного растительного сырья и фитопрепаратов: Учеб. пособие для студентов фармацев. вузов / В.А. Куркин, В.Б. Браславский, Е.В. Авдеева, О.Е. Правдивцева и др. – Самара: Офорт, 2007. – 126 с.
32. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для фармацевтических вузов (факультетов) / В.А. Куркин. – 5-е изд., перераб. и доп. – Самара: ООО «Офорт»: ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2020. – 1278 с.
33. Куркина, А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: монография / А.В. Куркина. – Самара: ООО «Офорт», ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. – 290 с.
34. Лавренов, В.К. Полная энциклопедия лекарственных растений/ В.К. Лавренов, Г.В. Лавренова. – СПб.: Нева; М.: ОЛМА-ПРЕСС, 1999. – Т. 2. – С. 579.
35. Лапина, А.С. Новые аспекты в морфолого-анатомической диагностике травы монарды дудчатой (*Monarda fistulosa* L.) / А. С. Лапина, В. А. Куркин, В. М. Рыжов, Л. В. Тарасенко // Аспирантский вестник Поволжья. – 2019. – № 1-2. – С. 19-26.
36. Лисицын А. 2021. Изображение *Nigella arvensis* L. // Плантариум. Растения и лишайники России и сопредельных стран: открытый онлайн атлас и определитель растений. [Электронный ресурс] URL: <https://www.plantarium.ru/page/image/id/689175.html> (дата обращения: 29.12.2021).

37. Мазо, В.К. Перспективы использования растительных полифенолов в качестве функциональных пищевых ингредиентов / В.К. Мазо, Ю.С. Сидорова, В.А. Саркисян, Т.Л. Киселева, А.А. Кочеткова // Вопросы питания. – 2018. – Т. 87. – № 6. – С. 57-66.
38. Макрушин, Н.М. Динамика урожайности семян чернушки посевной и подорожника блошного / Н. М. Макрушин, В. Э. Астафьева, Т. Ю. Майорова // Наук.праці ПФ «КАТУ» НАУ: С.-г. науки. –2007. – № 104. – С. 195–199.
39. Малыхина А.Г. 2014. Изображение *Nigella elata* Voiss. // Плантариум. Растения и лишайники России и сопредельных стран: открытый онлайн атлас и определитель растений. [Электронный ресурс] URL: <https://www.plantarium.ru/page/image/id/251802.html> (дата обращения: 29.12.2021).
40. Марахова, А.И. Унификация физико-химических методов анализа лекарственного растительного сырья и комплексных препаратов на растительной основе: дис. ... к. фармацев. н.: 14.04.02 / Марахова Анна Игоревна. – Самара, – 2017. – 313 с.
41. Мартинович, Г.Г. Окислительно-восстановительные процессы в клетках / Г. Г. Мартинович, С. Н. Черенкевич. – Минск : Белорусский государственный университет, 2008. – 159 с.
42. Масленников, А.В. Новые и редкие виды для флоры Ульяновской области / А.В. Масленников, Н.С. Раков / Биологические науки. – 1992. – № 8. – С. 46-52.
43. Маширова, С.Ю. Изучение компонентного состава липидов чернушки посевной и чернушки дамасской / С.Ю. Маширова, Т.В. Орловская // Науч. ведомости Белгород. гос. ун-та. Серия. Медицина. Фармация. – 2012. – Вып. 17, №4(123). – С.223-226.
44. Маширова, С.Ю. Исследование пептидов семян чернушки посевной и чернушки дамасской / С.Ю. Маширова, Т.В. Орловская // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. / под ред. М.В. Гаврилина. – Пятигорск, 2012. – Вып. 67. – С. 83-86.

45. Маширова, С.Ю. Фармакогностическое изучение семян чернушки дамасской (*Nigella damascena* L.), выращенной в условиях Ставропольского края: дис. ... канд. фармац. наук: 14.04.02 / Маширова Светлана Юрьевна. – Пятигорск, 2013. – 190 с.
46. Маширова, С.Ю. Фармакогностическое изучение семян чернушки дамасской (*Nigella damascena* L.), выращенной в условиях Ставропольского края: автореф. дис. ...канд. фарм. наук: 14.04.02 / Маширова Светлана Юрьевна. – Пятигорск, 2013. – 25 с.
47. Маширова, С.Ю. Элементный состав семян чернушки посевной и чернушки дамасской / С.Ю. Маширова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. – Пятигорск, 2012. – Вып. 67. – С. 81-83.
48. Мелик-Гусейнов, В.В. Растения народной медицины флоры России и сопредельных государств. Атлас: монография / В.В. Мелик-Гусейнов. – Пятигорск: ПятГФА, 2005. – 521 с.
49. Мубинов, А.Р. Жирнокислотный профиль и антиоксидантная активность жирного масла чернушки посевной / А.Р. Мубинов, Е.В. Авдеева, В.А. Куркин, Г.М. Латыпова, Р.Р. Фархутдинов, В.А. Катаев, Т.К. Рязанова // Химико-фармацевтический журнал. – 2021. – Т. 55. – № 8. – С. 45-49.
50. Мубинов, А.Р. Разработка подходов к стандартизации травы чернушки посевной / А.Р. Мубинов, В.А. Куркин, Е.В. Авдеева // Фармация. – 2021. – Т. 70. – № 8. – С. 36-41.
51. Мубинов, А.Р. Фитохимические и микробиологические аспекты изучения травы чернушки посевной (*Nigella sativa* L.) / А.Р. Мубинов, В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, С.Д. Колпакова, А.В. Жестков // Фармация и фармакология. – 2022. – Т. 10. – № 3. – С. 244-254.
52. Найда, Н.М. Сравнительная оценка биологических и морфометрических характеристик *Nigella sativa* в условиях Сирии и Ленинградской области / Н.М. Найда, М.С. Шлаш // Изв. С.-Петербур. гос. аграр. ун-та. – 2019. – Т. 2 (55). – С. 11-15.

53. Омаријева, М.Г. Обзор статей. Свойства чернушки посевной (*Nigella sativa*) / М.Г. Омаријева, П.М. Нурмагомедова // Медицина и здравоохранение: материалы II междунар. науч. конф. (Уфа, май, 2014 г). – Уфа, 2014. – С.62-65.
54. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. МУК 4.2.1890-04 // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2004. Т.6. – № 4. – С. 306-359.
55. Орловская, Т.В. Морфолого-анатомическое изучение семян чернушки посевной (*Nigella sativa* L.) и чернушки дамасской *Nigella damascena* L.) / Т.В. Орловская, С.Ю. Маширова // Традиционная медицина. – 2012. – № 3. – С. 54-57.
56. Орловская, Т.В. Фармакогностическое исследование некоторых культивируемых растений с целью расширения их использования в фармации: автореф. ... докт. фарм. наук: 14.04.02 / Т. В. Орловская – Пятигорск, 2011. – 49 с.
57. Патент РФ № 2134584 на изобретение «Способ получения иммуномодулирующего препарата «Настойка эхинацеи пурпурной»» / В.А. Куркин и др. – №. 97111362/14; заявл. 02.07.1997; опубл. 20.08.1999, Бюл. №23. – 11 с.
58. Петков, В. Современная фитотерапия. Пер. с болг. / под ред. В. Петкова. – София: Медицина и спорт, 1988. – С. 181.
59. Позднякова, Т.А. Изучение антиоксидантной активности травы астрагала солодколистного / Т.А. Позднякова, Р.А. Бубенчиков // Аспирантский вестник Поволжья. – 2019. – № 1–2. – С. 27–32.
60. Попова, Н.В. Лекарственные растения мировой флоры / Н.В. Попова, В.И. Литвиненко. – Харьков: СПДФЛ Мосякин В.Н., 2008. – 510 с.
61. Прокопов Г. 2008. Изображение *Nigella segetalis* M. Vieb. // Плантариум. Растения и лишайники России и сопредельных стран: открытый онлайн атлас и определитель растений. [Электронный ресурс]

URL: <https://www.plantarium.ru/page/image/id/4391.html> (дата обращения: 29.12.2021).

62. Прохоров, В.Н. Нигелла – ценная хозяйственно-полезная культура (обзор литературы) // Овощи России. – 2021. – №4. – С. 111-123.
63. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность / Отв. ред. А.Л. Буданцев. – СПб.; М.: Товарищество научных изданий КМК, 2008. – Т.1 Семейства *Magnoliaceae – Juglandaceae, Ulmaceae, Moraceae, Cannabaceae, Urticaceae*. – С. 49-50.
64. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование: Семейства *Magnoliaceae-Limoniaceae* / отв. ред. А.А. Федоров. – Л.: Наука. Ленинградское отделение, 1985. – С. 77-78.
65. Рудь, Н.К. Основные результаты фитохимического и фармакологического исследования чернушки посевной / Н.К. Рудь, А.М. Сампиев, Н.А. Давитавян // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2013. – № 25(168). – С. 207-212.
66. Рудь, Н.К. Разработка состава и технологии получения мягких желатиновых капсул сверхкритического углекислотного экстракта семян чернушки посевной / Н.К. Рудь, А.М. Сампиев, Н.А. Давитавян // Интермедикал, 2015. – № 4. – С. 152-156
67. Рудь, Н.К. Разработка технологии лекарственных средств из семян чернушки посевной и нормирование их качества: дис. ... канд. фармацевт. наук: 15.00.01 / Рудь Наталья Каремовна. – Пятигорск, 2017. – 170 с.
68. Рудь, Н.К. Разработка технологии получения сверхкритического углекислотного экстракта из семян чернушки посевной / Н.К. Рудь, А.М. Сампиев // Научное обозрение. – 2015. – № 5. – С.66-73.
69. Рудь, Н.К. Стандартизация сверхкритического углекислотного экстракта из семян чернушки посевной / Н.К. Рудь, Н.А. Давитавян, А.М. Сампиев // Актуальные проблемы медицины в России и за рубежом: сб. науч.

тр. по итогам междунар. науч. - практич. конф. - Новосибирск, 2015. – Вып. II. – С. 194-197.

70. Руководство по инструментальным методам исследований при разработке и экспертизе качества лекарственных препаратов / Под ред. С.Н. Быковского [и др.]. - М.: Изд-во Перо, 2014. - 656 с.

71. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей редакцией члена-корреспондента РАМН, профессора Р.У. Хабриева. – 2-изд., перераб. и доп. – М.: Издательство "Медицина", 2005. – 832 с.

72. Рыфф, Л.Э. О некоторых таксонах сосудистых растений, вновь обнаруженных в Крыму // Украинский ботанический журнал. – 2012. – Т. 69, № 2. – С. 223-231.

73. Сайбель, О.Л. Оценка антиоксидантной активности травы цикория обыкновенного (*Cichorium Intybus* L.) / О.Л. Сайбель, Т.Д. Даргаева, К.А. Пупыкина, И.В. Петрова, Р.Р. Фархутдинов // Acta Biomedica Scientifica (East Siberian Biomedical Journal). – 2017. – №2. – С. 85-88.

74. Сампиев, А.М. Фитохимическое изучение семян чернушки посевной / А.М. Сампиев, Н.К. Рудь, Н.А. Давитавян // Фундаментальные исследования. Фармацевтические науки. – 2014. – № 5. – С.114-117.

75. Самылина, И.А. Научные основы разработки и стандартизации лекарственных растительных средств / И. А. Самылина, В. А. Куркин, Г. П. Яковлев // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств. – 2016. – № 1. – С. 41-44.

76. Сдобнина, А.И. Диагностические признаки лекарственных растений в петиолярной анатомии / А.И. Сдобнина // Биоразнообразие: проблемы и перспективы сохранения: Материалы Международной научной конференции, посвященной 135-летию со дня рождения И.И. Спрыгина. – Пенза: Пензенский государственный педагогический университет им. В.Г. Белинского, 2008. – 420 с.

77. Скорина, В.В. Пряно-ароматические и эфирномасличные культуры: учебное пособие / В.В. Скорина, В.Н. Прохоров. – Минск: ИВЦ Минфина, 2018. – 215 с.
78. Справочник по лекарственным растениям / А.М. Задорожный, А.Г. Кошкин, С.Я. Соколов и др. – М.: Лесн. пром-сть, 1988 – 415 с.
79. Стоянов С. 2020. Изображение *Nigella orientalis* L. // Плантариум. Растения и лишайники России и сопредельных стран: открытый онлайн атлас и определитель растений. [Электронный ресурс] URL: <https://www.plantarium.ru/page/image/id/661107.html> (дата обращения: 29.12.2021).
80. Тахтаджян, А.Л. Система магнолиофитов / А.Л. Тахтаджян. – Л.: Наука, 1987. – 439 с.
81. Фархутдинов, Р.Р. Методики исследования хемилюминесценции биологического материала на хемилюминометре ХЛ-003 / Р.Р. Фархутдинов, С.И. Тевдорадзе // Методы оценки антиоксидантной активности биологически активных веществ лечебного и профилактического назначения: Сборник докладов. Под ред. проф. Е.Б. Бурлаковой. - М.: Изд-во РУДН, 2005. - С. 147-154.
82. Флора СССР: в 30-ти томах / под ред. В.Л. Комарова. – Л.: Издательство Академии Наук СССР, 1937. – Т. 7. – С. 62-72.
83. Хабибов, А.Д. Интродукционный анализ *Nigella sativa* L. во внутрэннегорном Дагестане / А.Д. Хабибов, У.Х. Кумаева, С.Ш. Шахбанова // Фундаментальные и прикладные проблемы ботаники в начале XXI века. Русское ботаническое общество. Экологическая физиология и биохимия растений. – 2008. – № 6. – С. 363-365.
84. Хасанов, В.В. Методы исследования антиоксидантов / В.В. Хасанов, Г.Л. Рыжова, Е.В. Мальцева // Химия растит. сырья. – 2004. – № 3. – С. 63–75.
85. Черенкевич, С.Н. Редокс-регуляция клеточной активности: концепции и механизмы / С.Н. Черенкевич, Г.Г. Мартинович, Мартинович И.В., Горудко

- И.В., Шамова Е.В. // Известия Национальной академии Беларуси. Серия биологических наук. – 2013. – № 1. – С. 92-108.
86. Чибисова, О.И. Новый англо-русский биологический словарь / О.И. Чибисова, Н.Н. Смирнов, С.Г. Васецкий. – М.: Руссо, 2003 г. – 920 с.
87. Шарофова, М.У. Исследование антидиабетических свойств надземных частей чернушки посевной (*Nigella sativa* L.) / М.У. Шарофова, Ю.Н. Нуралиев, П.Д. Шабанов, Ш.С. Сагдиева, П.Ш. Сухробов, С.Р. Нуъмонов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2018. – Т. 21, № 10. – С. 112–118.
88. Шиков, А.Н. Растительные масла и масляные экстракты: технология, стандартизация, свойства / А.Н. Шиков, В.Г. Макаров, В.Е. Рыженков. - М.: Из-дат. дом «Русский врач», 2004. – 264 с.
89. Шиш, С.Н. Физиолого-биохимические особенности *Nigella sativa* L. при культивировании в Беларуси / С.Н. Шиш, А.Г. Шутова, Е.В. Спиридович, Е.Д. Скаковский, Л.Ю. Тычинская, Ж.Э. Мазец // Роль ботанических садов и дендрариев в сохранении, изучении и устойчивом использовании разнообразия растительного мира: материалы Междунар. науч. конф., посвящ. 85-летию Центр. ботан. сада НАН Беларуси. – Минск: Медисонт, 2017. – № 2. – С. 152-156.
90. Шлаш, М. Некоторые биологические особенности семян чернушки посевной / М. Шлаш, Н.М. Найда // Актуальные проблемы инноваций с нетрадиционными растительными ресурсами и создания функциональных продуктов: сборник научных трудов, 2003. – № 7. – С.177-181.
91. Шлаш, М. Особенности цветения и опыления чернушки посевной / М. Шлаш, Н.М. Найда, А.А. Детков // Новые и нетрадиционные растения и перспективы их практического использования: материалы V Международного симпозиума, 2003 – Т. 2. – С. 108-111.
92. Шлаш, М.С. Онтогенез и перспективы рационального использования *Nigella sativa* в условиях Сирии: автореф. дис... канд. биол. наук: 03.00.05 / Шлаш Мухамед Салех – СПб, 2004. - 19 с.

93. Энциклопедия лекарственных растений. Пер. с нем. / Предисл. И.А. Губанова. – М.: Мир, 1998. – 467 с.
94. Abbasalizad, F. The effects of *Nigella sativa* on thyroid function, serum Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) – 1, Nesfatin-1 and anthropometric features in patients with Hashimoto's thyroiditis: a randomized controlled trial / F. Abbasalizad, D. Mahdieh, T. Parvin, A. Siroos, M. Mehran // BMC Complementary & Alternative Medicine. – 2016. – Vol. 16, No. 1. – A. 471.
95. Abdalla, M. Czarnuszka jako surowiec piekarski / M. Abdalla // Przegl. Piek. Cuk. – 2002. – Vol. 50, No. 3. – P. 6-8.
96. Abou-Basha, L. Thin layer chromatographic assay of thymoquinone in black seed oil and identification of dithymoquinone and thymol / L. Abou-Basha, M.S. Rashed, H.Y. Aboul-Enein // Journal of Liquid Chromatography. – 1995. – No. 18. – P. 105-115.
97. Aftab, A. *Nigella sativa* L. from traditional to contemporary medicine: a review / A. Aftab, Y. Zubaida, J. Arshad, R. Ashiq, A. Shakeel, K. Farah // International Journal of Biology and Biotechnology. – 2018. – Vol. 15, No. 2. – P. 237-254.
98. Aftab, A. Pharmacological screening and GC-MS analysis of vegetative/reproductive parts of *Nigella sativa* L. / A. Aftab, Z. Yousaf, Z. Aftab, A. Younas, N. Riaz, M. Rashid, H.B. Shamsheer, Z. Razzaq, A. Javaid // Pak. J. Pharm. Sci. – 2020. – Vol. 33, No. 5. – P. 2103-2111.
99. Ahmad, A. A review on therapeutic potential of *Nigella sativa*: A miracle herb / A. Ahmad, A. Husain, M. Mujeeb, S.A. Khan, A.K. Najmi, N.A. Siddique, Z.A. Damanhour, F. Anwar // Asian Pac J Trop Biomed. – 2013. – Vol. 3, No. 5. – P. 337-352.
100. Akram Khan, M. Chemical composition of *Nigella sativa* Linn: Part 2 Recent advances / M. Akram Khan, M. Afzal // Inflammopharmacology. – 2016. – Vol. 24, No. 2-3. – P. 67-79.
101. Ali, B.H. Pharmacological and toxicological properties of *Nigella sativa* / B. H. Ali, G. Blunden // Phytotherapy Research. – 2003. – Vol.17, No. 4. – P. 299-305.

102. Aljabre, S. Dermatological effects of *Nigella sativa* / S. Aljabre, O.M. Alakloby, M.A. Randhawa // Journal of Dermatology & Dermatologic Surgery. – 2015. – Vol. 19, No. 2. – P. 92-98.
103. Al-Kayssi, A.W. Impact of soil water stress on Nigellone oil content of black cummin seeds grown in calcareous-gypsiferous soils / A.W. Al-Kayssi, R.M. Shihab, S.H. Mustafa // Agricultural Water Management. – 2011. – Vol. 100, No. 1. – P.46-57.
104. Amin, B. Black Cummin (*Nigella sativa*) and Its Active Constituent, Thymoquinone: An Overview on the Analgesic and Anti-inflammatory Effects / B. Amin, H. Hosseinzadeh // Planta Med. – 2016. – Vol. 82, No. 1-2. – P. 8-16.
105. Ansari, A.A. Structural studies on a saponin isolated from *Nigella sativa* / A.A. Ansari, S. Hassan, L. Kenne, Atta-Ur-Rahman, T. Wehler // Phytochemistry. – 1998. – Vol. 27, No. 12. – P. 3977-3979.
106. Arici, M. Antibacterial effect of Turkish black cummin (*Nigella sativa* L.) oils / M. Arici, O. Sagdic, U. Gecgel // Grasas y Aceites. – 2005. – Vol. 56, No. 4. – P. 259-262.
107. Atta-ur-Rahman, Ed. Nigellidine – a new indazole alkaloid from the seed of *Nigella sativa* / Ed. Atta-ur-Rahman, S. Malik, S. Sadiq, M. Choudhary, Z. Ni, J. Clardy, S.J. Taufiq-ur-Rahman, S.S. Hasan, M.I. Choudhary // Tetrahedron Lett. – 1995. – Vol. 36, No. 12. – P. 1993-1996.
108. Bamosa, A.O. Effect of *Nigella sativa* seeds on the glycemic control of patients with type 2 diabetes mellitus / A.O. Bamosa, H. Kaatabi, F. Lebdaa, A.M. Elq, A. Al-Sultanb // Indian J Physiol Pharmacol. – 2010. – Vol. 54, No. 4. – P. 344–354.
109. Belete, Y. HPTLC assay of thymoquinone in black seed and black seed oil (*Nigella Sativa* Linn) and identification of thymoquinone conversion with Uv-Vis / Y. Belete, E. Dagne // Journal of Drug Delivery & Therapeutics. – 2014. – Vol. 4, No. 4. – P. 1-5.

110. Boskabady, M.H. Antiasthmatic effect of *Nigella sativa* in airways of asthmatic patients / M.H. Boskabady, N. Mohsenpoor, L. Takaloo // *Phytomedicine*. – 2010. – Vol. 17, No. 10. – P. 707-713.
111. Boskabady, M.H. The possible prophylactic effect of *N. sativa* seed extract in asthmatic patients / M.H. Boskabady, H. Javan, M. Sajady, H. Rakhshandeh // *Fundamental & Clinical Pharmacology*. – 2007. – Vol. 21, No. 5. – P. 559-566.
112. Botnick, I. Distribution of Primary and Specialized Metabolites in *Nigella sativa* Seeds, a Spice with Vast Traditional and Historical Uses / I. Botnick, W. Xue, E. Bar, M. Ibdah, A. Schwartz, D.M. Joel, E. Lev, A. Fait, E. Lewinsohn // *Molecules*. – 2012. – Vol. 17, No. 9. – P. 10159-10177.
113. Bourgou, S. Phenolic composition and biological activities of Tunisian *Nigella sativa* L. shoots and roots / S. Bourgou, R. Ksouri, A. Bellila, I. Skandrani, H. Falleh, B. Marzouk // *C. R. Biologies*. – 2008. – No. 331. – P. 48-55.
114. Chaieb, K. Antibacterial activity of thymoquinone, an active principle of *Nigella sativa* and its potency to prevent bacterial biofilm formation / K. Chaieb, B. Kouidhi, H.J. Harzallah, M. Kacem // *BMC Complementary and Alternative Medicine*. – 2011. – Vol. 11, No. 1. – P. 29-34.
115. Cheikh-Rouhou, S. *Nigella sativa* L.: Chemical composition and physicochemical characteristics of lipid fraction / S. Cheikh-Rouhou, S. Besbes, B. Hentati, C. Blecker, C. Deroanne, H. Attia // *Food Chemistry*. – 2007. – Vol. 101, No. 2. – P. 673-681.
116. Cheikh-Rouhou, S. Sterol composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) and Aleppo pine (*Pinus halepensis* Mill.) seed oils / S. Cheikh-Rouhou, S. Besbes, G. Lognay, C. Blecker // *Journal of Food Composition and Analysis*. – 2008. – Vol. 21, No. 2. – P. 162-168.
117. Chikezie, P. Oxidative stress in diabetes mellitus / P. Chikezie, O. Ojiako, A. Ogbuji // *Journal of Biological Chemistry*. – 2015. – Vol. 9, No. 3. – P. 92-109.
118. Dasgupta A, Krasowski M.D. Chapter 10 - Therapeutic drug monitoring of antimicrobial, antifungal and antiviral agents, *Therapeutic Drug Monitoring Data (Fourth Edition)*, Academic Press. – 2020. – P. 159-197.

119. Datta, A.K. Black cumin (*Nigella sativa* L.) - a review / A.K. Datta, A. Saha, A. Bhattacharya, A. Mandal, R. Paul, S. Sengupta // Journal of plant development sciences. – 2012. – Vol. 4. – P. 1-43.
120. Dehkordi, F. Antihypertensive effect of *Nigella sativa* seed extract in patients with mild hypertension / F. Dehkordi, A. Kamkhah // Fundamental & Clinical Pharmacology. – 2008. – Vol. 22, No. 4. – P. 447-452.
121. Edris, A.E. Anti-cancer properties of *Nigella* spp. essential oils and their major constituents, thymoquinone and beta-elemene / A.E. Edris // Curr Clin Pharmacol. – 2009. – Vol. 4, No. 1. – P. 43-46.
122. Elbandy, M. Two New Antiinflammatory Triterpene Saponins from the Egyptian Medicinal Food Black Cumin (Seeds of *Nigella sativa*) / M. Elbandy, O. Kang, D. Kwon, J. Rho // Bull. Korean Chem. Soc. – 2009. – Vol. 30, No. 8. – P. 1811-1816.
123. El-Dakhakhny, M. *Nigella sativa* oil, nigellone and derived thymoquinone inhibit synthesis of 5-lipoxygenase products in polymorphonuclear leukocytes from rats / M. El-Dakhakhny, N.J. Madi, N. Lembert, H.P.T. Ammon // J Ethnopharmacol. – 2002. – Vol. 81, No. 2. – P. 161-164.
124. El-Dakhakhny, M. The hypoglycemic effect of *Nigella sativa* oil is mediated by extrapancreatic actions / M. El-Dakhakhny, N. Mady, N. Lembert, H.P. Ammon // Planta Med. – 2002. – Vol. 6, No. 5. – P. 465-466.
125. Ghamarnia, H. Yield and water use efficiency of (*Nigella sativa* L.) under different irrigation treatments in a semi arid region in the West of Iran / H. Ghamarnia, S. Sepehri // J. Med. Plants Res. – 2010. – Vol. 4, No. 16. – P. 1612–1616.
126. Gharby, S. Chemical investigation of *Nigella sativa* L. seed oil produced in Morocco / S. Gharby, H. Harhar, D. Guillaume, A. Roudani, S. Boulbaroud, M. Ibrahim, M. Ahmad, S. Sultana, T. Ben Hadda, I. Chafchaoui-Moussaoui, Zoubida Charrouf // J Saudi Soc Agric Sci. – 2015. – Vol. 14, No. 2. – P. 172-177.
127. Golus, J. The agar microdilution method – a new method for antimicrobial susceptibility testing for essential oils and plant extracts / J. Golus, R. Sawicki, J.

- Widelski, G. Ginalska // J Appl Microbiol. – 2016. – Vol 121, No. 5. – P. 1291-1299.
128. Gray, JP. Thymoquinone, a bioactive component of *Nigella sativa*, normalizes insulin secretion from pancreatic β -cells under glucose overload via regulation of malonyl-CoA / J.P. Gray, D.Z. Burgos, T. Yuan, N. Seeram, R. Rebar, R. Follmer, E.A. Heart // Am J Physiol Endocrinol Metab. – 2016. – Vol. 310, No. 6. – A. E394-404.
129. Hamdy, N. Effects of *Nigella sativa* oil and thymoquinone on oxidative stress and neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats / N. Hamdy, R. Taha // Pharmacology. – 2009. – Vol. 84, No. 3. – P. 127-134.
130. Hariharan, P. In vitro profiling of antimethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* activity of thymoquinone against selected type and clinical strains / P. Hariharan, M. Paul-Satyaseela, A. Gnanamani // Lett Appl Microbiol. – 2016. – Vol. 62, No. 3. – 283-289.
131. Harzallah, H.J. Chemical composition, antimicrobial potential against cariogenic bacteria and cytotoxic activity of Tunisian *Nigella sativa* essential oil and thymoquinone / H.J. Harzallah, B. Kouidhi, G. Flamini, A. Bakhrouf, T. Mahjoub // Food Chemistry. – 2011. – Vol. 129, No. 4. – P. 1469-1474.
132. Harzallah, H.J. Thymoquinone, the *Nigella sativa* bioactive compound, prevents circulatory oxidative stress caused by 1,2-dimethylhydrazine in erythrocyte during colon postinitiation carcinogenesis / H.J. Harzallah, R. Grayaa, W. Kharoubi, A. Maaloul, M. Hammami, T. Mahjoub // Oxid Med Cell Longev. – 2012. – A. 854065.
133. Haseena, S. Phytochemical analysis of *Nigella sativa* and its effect on reproductive system / S. Haseena, A. Manjunath, K.D. Kusal, S.H. Saheb // Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. – 2015. – Vol. 7, No. 8. – P. 514-517.
134. Hayes J.D. Oxidative Stress in Cancer / J.D. Hayes, A.T. Dinkova-Kostova, K.D. Tew // Cancer Cell. – 2020. – Vol. 38, No. 2. – P. 167-197.
135. Heiss, A.G. Seed Morphology of *Nigella* s.l. (Ranunculaceae): Identification, Diagnostic Traits, and Their Potential Phylogenetic Relevance / A.G. Heiss, M.

- Kropf, S. Sontag, A. Weber // International Journal of Plant Sciences. – 2011. – Vol. 172, No. 2 – P. 267-284.
136. Ijaz, H. Review: *Nigella sativa* (Prophetic Medicine): A Review / H. Ijaz, U.R. Tulain, J. Qureshi, Z. Danish, S. Musayab, M.F. Akhtar, A. Saleem, K.K. Khan, M. Zaman, I. Waheed, I. Khan, M. Abdel-Daim // Pak J Pharm Sci. – 2017. – Vol. 30, No. 1. – P. 229-234.
137. Islam, M.T. Nigellalogy: a review on *Nigella Sativa* / M.T. Islam, B. Guha, S. Hosen, T.A. Riaz, S. Shahadat, L.R. Sousa, J.V. Santos, J.J. Silva, R.M. Tôrres de Lima, A.L. Braga, A.C. Reis, M.V. Alencar, A.A. Melo-Cavalcante // MOJ Bioequivalence & Bioavailability. – 2017. – Vol. 3, No. 6. – P. 167-181.
138. Ivankovic, S. The antitumor activity of thymoquinone and thymohydroquinone in vitro and in vivo / S. Ivankovic, R. Stojkovic, M. Jukic, M. Milos, M. Milos, M. Jurin // Experimental Oncology. – 2006. – Vol. 28, No. 3. – P.220-224.
139. Javidi, S. A review of Neuropharmacology Effects of *Nigella sativa* and Its Main Component, Thymoquinone / S. Javidi, B.M. Razavi, H. Hosseinzadeh // Phytother Res. – 2016. – Vol. 30, No. 8. – P. 1219-1229.
140. Jukić, M. Catalytic Oxidation and Antioxidant Properties of Thyme Essential Oils (*Thymus vulgarae* L.) / M. Jukić, M. Miloš // Croatica Chemica Acta. – 2005. – Vol. 78, No. 1. – P. 105-110.
141. Kabir, Y. Volatile compounds of black cumin (*Nigella sativa* L.) seeds cultivated in Bangladesh and India / Y. Kabir, Y. Akasaka-Hashimoto, K. Kubota, M. Komai // Heliyon. – 2020. – Vol. 6, No. 10. – A. e05343.
142. Kanter, M. Hepatoprotective effects of *Nigella sativa* L. and *Urtica dioica* L. on lipid peroxidation, antioxidant enzyme systems and liver enzymes in carbon tetrachloride-treated rats / M. Kanter, O. Coskun, M. Budancamanak // World Journal of Gastroenterology. – 2005. – Vol. 11, No. 42. – P. 6684-6688.
143. Kattoor, A. Oxidative stress in atherosclerosis / A. Kattoor, N. Pothineni, D. Palagiri, J. Mehta // Current Atherosclerosis Reports. – 2017. – Vol. 19, No. 11. – P. 32-42.

144. Kökdil, G. Morphology and stem anatomy of some species of genus *Nigella* L. in Turkey / G. Kökdil, A. İlçim, B. Özbilgin, C. Uygun // J.Fac.Pharm. – 2006. – Vol. 35, No. 1. – P. 19-41.
145. Kokoska, L. Comparison of chemical composition and antibacterial activity of *Nigella sativa* seed essential oils obtained by different extraction methods / L. Kokoska, J. Havlik, I. Valterova, H. Sovova // Journal of Food Protection. – 2008. – Vol. 71, No. 12. – P. 2475-2480.
146. Larsson, D.G. Antibiotic resistance in the environment / D.G. Larsson, C.F. Flach // Nat Rev Microbiol. – 2021. – No. 20. – P. 257-269.
147. Lutterodt, H. Fatty acid profile, thymoquinone content, oxidative stability, and antioxidant properties of cold-pressed black cumin seed oils / H. Lutterodt, M. Luther, M. Slavin, J. Yin, J. Parry, J. Gao, L. Yu // LWT - Food Science and Technology. – 2010. – Vol. 43, No. 9. – P. 1409-1413.
148. Mahmmoud, Yasser A. Oleic and linoleic acids are active principles in *Nigella sativa* and stabilize an E2P conformation of the Na, K-ATPase. Fatty acids differentially regulate cardiac glycoside interaction with the pump / Yasser A. Mahmmoud, S. Brøgger Christensen // Biochimica et Biophysica Acta. – 2011. – Vol. 1808, No. 10. – P. 2413-2420.
149. Margout, D. Morphological, microscopic and chemical comparison between *Nigella sativa* L. (black cumin) and *Nigella damascena* L. cv / D. Margout, M. Kelly, S. Meunier, Doris Auinger, Y. Pélissier, M. Larroque, Karl-Franzens-Universität Graz // J. of Food, Agriculture & Environment. – 2013. – Vol. 11, No. 1. – P. 132–138.
150. Matthaus, B. Fatty Acids, Tocopherol, and Sterol Contents of Some *Nigella* Species Seed Oil / B Matthaus, M. M. Ozcan // Czech J. Food Sci. – 2011. – No. 29. – P. 145-150.
151. Mehta, B.K. A new naturally acetylated triterpene saponin from *Nigella sativa* / B.K. Mehta, P. Mehta, M. Gupta // Carbohydrate Research. – 2009. – Vol. 344, No. 1. – P. 149-151.

152. Mohammad, H.B. The effect of *Nigella sativa* alone, and in combination with dexamethasone, on tracheal muscle responsiveness and lung inflammation in sulfur mustard exposed guinea pigs / H.B. Mohammad, N. Vahedi, S. Amery, M. Reza Khakzad // J Ethnopharmacol. – 2011. – Vol. 137, No. 2. – P. 1028- 1034.
153. Mohammad, R.K. Possible therapeutic effects of *Nigella sativa* and its thymoquinone on COVID-19 / R.K. Mohammad, G. Shoukouh, S. Mahmood // Pharm Biol. – 2021. – Vol. 59, No. 1. – P. 696-703.
154. Mulyaningsih, S. Antibacterial activity of essential oils from Eucalyptus and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens / S. Mulyaningsih, F. Sporer, J. Reichling, M. Wink // Pharm Biol. – 2011. – Vol. 49, No. 9. – P. 893-899.
155. Nadaf, N.H. Exploring anti-yeast activity of *Nigella sativa* seed extracts / N.H. Nadaf, S.S. Gawade, A.S. Muniv, S.R. Waghmare, D.B. Jadhav, K.D. Sonawane // Industrial Crops and Products. – 2015. – Vol. 77. – P. 624-630.
156. Nagi, M.N. Thymoquinone supplementation reverses acetaminophen-induced oxidative stress, nitric oxide production and energy decline in mice liver / M.N. Nagi, H.A. Almakki, M.M. Sayed-Ahmed, A.M. Al-Bekairi // Food Chem Toxicol. – 2010. – Vol. 48, No. 8-9. – P. 2361-2365.
157. Najmi, A. Effect of *Nigella sativa* oil on various clinical and biochemical parameters of insulin resistance syndrome / A. Najmi, M. Nasiruddin, R.A. Khan, S.F. Haque // Int J Diabetes Dev Ctries. – 2008. – Vol. 28, No. 1. – P. 11-14.
158. Namazi, N. Review: The effects of *Nigella sativa* L. on obesity: A systematic review and meta-analysis / N. Namazi, L. Bagher, A.H. Mohammad, A. Mohammad // Journal of Ethnopharmacology. – 2018. – No. 219. – P.173-181.
159. Ng, W.K. Thymoquinone from *Nigella sativa* was more potent than cisplatin in eliminating of SiHa cells via apoptosis with down-regulation of Bcl-2 protein / W.K. Ng, L.S. Yazan, M. Ismail // Toxicology in Vitro. – 2011. – Vol. 25, No. 7 - P. 1392-1398.

160. Nickavar, B. Chemical composition of the fixed and volatile oils of *Nigella sativa* L. from Iran / B. Nickavar, F. Mojab, K. Javidnia, M.A. Amoli // Zeitschrift für Naturforschung. – 2003. – Vol. 58, No. 9-10. – P. 629-631.
161. Nikakhlagh, S. Herbal treatment of allergic rhinitis: the use of *Nigella sativa* / S. Nikakhlagh, F. Rahim, F. Hossein Nejad Aryani, A. Syahpoush, M.G. Brougerdnya, N. Saki // Am J Otolaryngol. – 2011. – Vol. 32, No. 5 – P. 402–407.
162. Ozer, H.V. Response of black cumin (*Nigella sativa* L.) to deficit irrigation in a semi-arid region: growth, yield, quality, and water productivity / H. Ozer, F. Coban, U. Sahin, S. Ors // Industrial Crops and Products. – 2020. – Vol. 144. – A. 112048.
163. Paarakh, P.M. *Nigella sativa* Linn. - A comprehensive review / P.M. Paarakh // Indian J. Nat. Prod. – 2010. – Vol.1. – P. 409-429.
164. Padmaa, P.M. *Nigella sativa* Linn. - A comprehensive review / P.M. Padmaa // Indian Journal of Natural Products and Resources. – 2010. – Vol. 1, No. 4. – P.409-429.
165. Parveen, A. A New Oleanane Type Saponin from the Aerial Parts of *Nigella sativa* with Anti-Oxidant and Anti-Diabetic Potential / A. Parveen, M.A. Farooq, W.W. Kyunn // Molecules. – 2020. – Vol. 25, No. 9. – A. 2171.
166. Pop, R.M. Future Perspectives on *Nigella Sativa*: Characterization and Pharmacological Properties / R.M. Pop // Series: Herbs and Herbalism. New York: Nova Biomedical, 2018. – 280 p.
167. Proestos, C. Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity / C. Proestos, I.S. Boziaris, G.-J.E. Nychas, M. Komaitis // Food Chem. – 2006. – Vol. 95, No. 4. – P. 664–671.
168. Ragheb, A. Attenuation of the development of hypercholesterolemic atherosclerosis by thymoquinone / A. Ragheb, F. Elbarbry, K. Prasad, A. Mohamed, M.S. Ahmed, A. Shoker // Int J Angiol. – 2008. – Vol. 17, No. 4. – P. 186-192.

169. Ramadan, M.F. Characterization of phospholipid composition of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oil / M.F. Ramadan, J.T. Mörsel // *Nahrung*. – 2002. – Vol. 46, No. 4. – P. 240-244.
170. Ramadan, M.F. Nutritional value, functional properties and nutraceutical applications of black cumin (*Nigella sativa* L.): an overview / M.F. Ramadan // *International Journal of Food Science & Technology*. – 2007. – Vol. 42, No. 10. – P. 1208-1218.
171. Randhawa, M.A. Anticancer activity of *Nigella sativa* (black seed) - a review / M.A. Randhawa, M.S. Alghamdi // *Am J Chin Med*. – 2011. – Vol. 39, No. 6. – P. 1075-1091.
172. Rashid, S. Microscopic investigations and pharmacognostic techniques used for the standardization of herbal drug *Nigella sativa* L. / S. Rashid, M. Zafar, M. Ahmad, F. Ahmad Lone, S. Shaheen, S. Sultana, S. Ashfaq, M.I. Shinwari // *Microscopy Research and Technique*. – 2018. – Vol. 81, No. 12. – P. 1443-1450.
173. Ravindran, J. Thymoquinone poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles exhibit enhanced anti-proliferative, anti-inflammatory, and chemosensitization potential / J. Ravindran, H.B. Nair, B. Sung, S. Prasad, R.R. Tekmal, B.B. Aggarwal // *Biochemical Pharmacology*. – 2010. – Vol. 79, No. 11 – P. 1640-1647.
174. Rezaei-Chiyaneh, E. Response of Seed Yield and Essential oil of Black Cumin (*Nigella sativa* L.) Affected as Foliar Spraying of Nano-fertilizers / E. Rezaei-Chiyaneh, S. Rahimi, A. Rahimi, H. Hadi, H. Mahdaviakia // *Journal of Medicinal Plants and By-products*. – 2018. – Vol. 7, No. 1. – 33-40.
175. Salehi, B. *Nigella* Plants – Traditional Uses, Bioactive Phytoconstituents, Preclinical and Clinical Studies / B. Salehi, C. Quispe, M. Imran, I. Ul-Haq, J. Živković, I.M. Abu-Reidah, S. Sen, Y. Taheri, K. Acharya, H. Azadi, M. Del Mar Contreras, A. Segura-Carretero, D. Mnayer, G. Sethi, M. Martorell, A.F. Abdull Razis, U. Sunusi, R.M. Kamal, H.A. Rasul Suleria, J. Sharifi-Rad // *Frontiers in Pharmacology*. – 2021. – Vol. 12. – A. 625386.

176. Salem, M.L. Immunomodulatory and therapeutic properties of the *Nigella sativa* L. seed / M.L. Salem // International Immunopharmacology. – 2005. – Vol. 5., No. 13-14. – P. 1749-1770.
177. Samarghandian, S. A Review on Possible Therapeutic Effect of *Nigella sativa* and Thymoquinone in Neurodegenerative Diseases / S. Samarghandian, T. Farkhondeh, F. Samini // CNS Neurol Disord Drug Targets. – 2018. – Vol. 17, No. 6. – P. 412-420.
178. Sari, Y. A. Comparative Study of the Effects of *Nigella sativa* Oil Gel and Aloe Vera Gel on Wound Healing in Diabetic Rats / Y. Sari, I. Purnawan, D.W. Kurniawan, E. Sutrisna // J Evid Based Integr Med. – 2018. – No. 23. – A. 2515690X18772804.
179. Scholz, M. Methyl jasmonate induced accumulation of kalopanaxsaponin I in *Nigella sativa* / M. Scholz, M. Lipinski, M. Leupold, H. Luftmann, I. Harig, R. Ofir, R. Fischer, D. Prüfer, K.J. Müller // Phytochemistry. – 2009. – Vol. 70, No. 4 – P. 517-522.
180. Setiawati, E. Pertumbuhan Jintan Hitam (*Nigella sativa* L.) pada Tingkat Naungan dan Pemupukan Nitrogen yang Berbeda / E. Setiawati, A. Kurniawati, W.D. Widodo // Jurnal Agronomi Indonesia. – 2018. – Vol. 46, No. 2. – P. 202-207.
181. Taskin, M.K. Triterpene Saponins from *Nigella sativa* L. / M.K. Taskin, O.A. Caliskan, H. Anil, H. Abou-Gazar, I.A. Khan, E. Bedir // Turk J Chem. – 2005. – Vol. 29, No. 5. – P. 561-569.
182. Telci, I. Comparison of Seed Oil Composition of *Nigella sativa* L. and *N. damascena* L. During Seed Maturation Stages / I. Telci, A. Sahin-Yaglioglu, F. Eser, H. Aksit, I. Demirtas, S. Tekin // Journal of the American Oil Chemists' Society. – 2014. – Vol. 91, No. 10. – P. 1723–1729.
183. Tohidpour, A. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) / A. Tohidpour, M. Sattari, R. Omidbaigi, A. Yadegar, J. Nazemi // Phytomedicine. – 2010. – Vol. 17, No. 2. – P. 142-145.

184. Toma, C.C. Histo-anatomical study on the *Nigella damascena* L. (Ranunculaceae) species / C.C. Toma, L. Bejenaru, C. Bejenaru, G.D. Mogosanu // *Oltenia-Studii și comunicări. Științele naturii.* – 2007. – Vol. 23 – P. 57-60.
185. Udu, R. Antimalarial Activity of *Nigella sativa* L. Seed Extracts and Selection of Resistance in *Plasmodium berghei* ANKA in a Mouse Model / R. Udu, J. Oyweri, J. Gathirwa // *Journal of Pathogens.* – 2021. – Vol. 12. – P. 1-10.
186. Viuda-Martos, M. In vitro antioxidant and antibacterial activities of essential oils obtained from Egyptian aromatic plants / M. Viuda-Martos, M.A. Mohamady, J. Fernández-López, K.A. Abd El-Razik, E.A. Omer, J.A. Pérez-Alvarez, E. Sendra // *Food Control.* – 2011. – Vol. 22, No. 11. – P. 1715-1722.
187. Walusansa, A. Antibiotic-resistance in medically important bacteria isolated from commercial herbal medicines in Africa from 2000 to 2021: a systematic review and meta-analysis / A. Walusansa, S. Asiimwe, J.L. Nakavuma, J.E. Ssenku, E. Katuura, H.M. Kafeero, D. Aruhomukama, A. Nabatanzi, G. Anywar, A.K. Tugume, E.K. Kakudidi // *Antimicrob Resist Infect Control.* – 2022. – Vol. 11. – Art. No.11.
188. Wienkotter, N. The effect of nigellone and thymoquinone on inhibiting trachea contraction and mucociliary clearance / N. Wienkotter, D. Höpner, U. Schütte, K. Bauer, F. Begrow, M. El-Dakhakhny, E.J. Verspohl // *Planta Med.* – 2008. – Vol. 74, No. 2. – P.105- 108.
189. Woo, C.C. Anticancer activity of thymoquinone in breast cancer cells: possible involvement of PPAR- γ pathway / C.C. Woo, S.Y. Loo, V. Gee, C.W. Yap, G. Sethi, A.P. Kumar, K.H. Tan // *Biochemical Pharmacology.* – 2011. – Vol. 82, No. 5. – P.464-475.
190. Woo, C.C. Thymoquinone: Potential cure for inflammatory disorders and cancer / C.C. Woo, A.P. Kumar, G. Sethi, K.H. Benny Tan // *Biochem Pharmacol.* – 2012. – Vol. 83, No. 4. – P. 443-451.
191. Xu, H. Computational and Experimental Studies Reveal That Thymoquinone Blocks the Entry of Coronaviruses Into In Vitro Cells / H. Xu, B. Liu, Z. Xiao, M. Zhou, L. Ge, F. Jia, Y. Liu, H. Jin, X. Zhu, J. Gao, J. Akhtar, B. Xiang, K. Tan, G. Wang // *Infect Dis Ther.* – 2021. – Vol. 10, No. 1. – P. 483–494.

192. Yessuf, A.M. Phytochemical Extraction and Screening of Bio Active Compounds from Black Cumin (*Nigella Sativa*) Seeds Extract / A.M. Yessuf // American Journal of Life Sciences. – 2015. – Vol. 3, No. 35. – P. 358-364.

ПРИЛОЖЕНИЯ

**Приложение 1. Люминесцентная микроскопия
травы чернушки посевной**

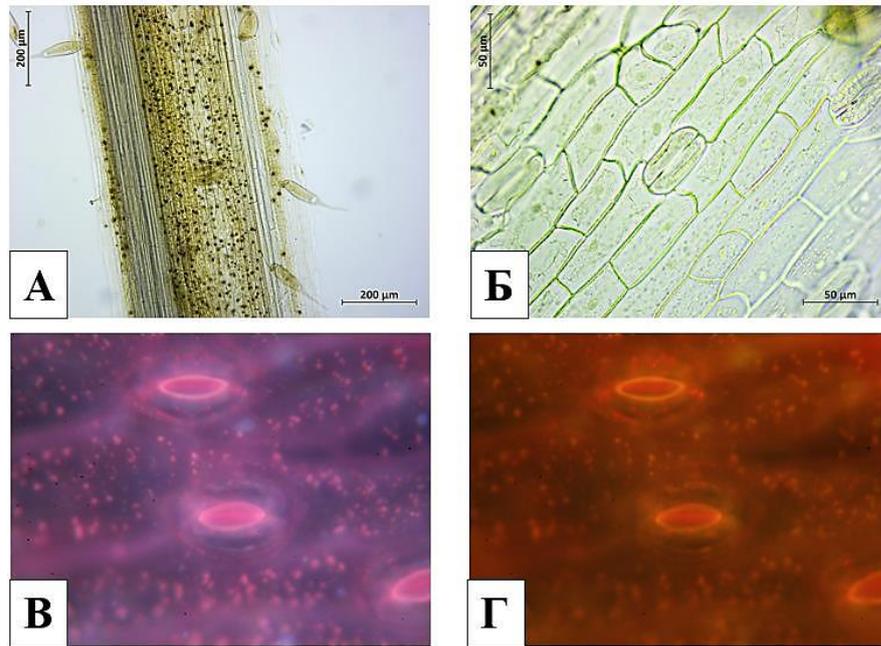


Рисунок 1 – Эпидермис стебля чернушки посевной: А – общий вид эпидермиса стебля (x100); Б – устьичный аппарат при дневном свете (x400); В – люминесценция устьичного аппарата при $\lambda=360$ нм (x400); Г – люминесценция устьичного аппарата при $\lambda=420$ нм (x400)

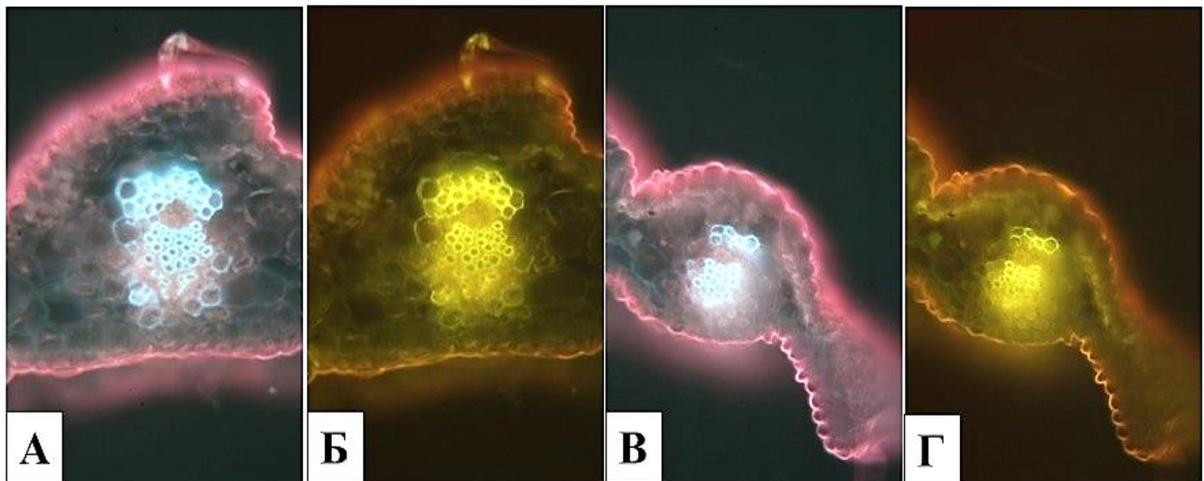


Рисунок 2 – Люминесценция поперечных срезов черешка листа чернушки посевной: А – центральный проводящий пучок при $\lambda=360$ нм (x100); Б – центральный проводящий пучок при $\lambda=420$ нм (x100); В – проводящий пучок на конце черешка при $\lambda=360$ нм (x400); Г – проводящий пучок на конце черешка при $\lambda=420$ нм (x400)

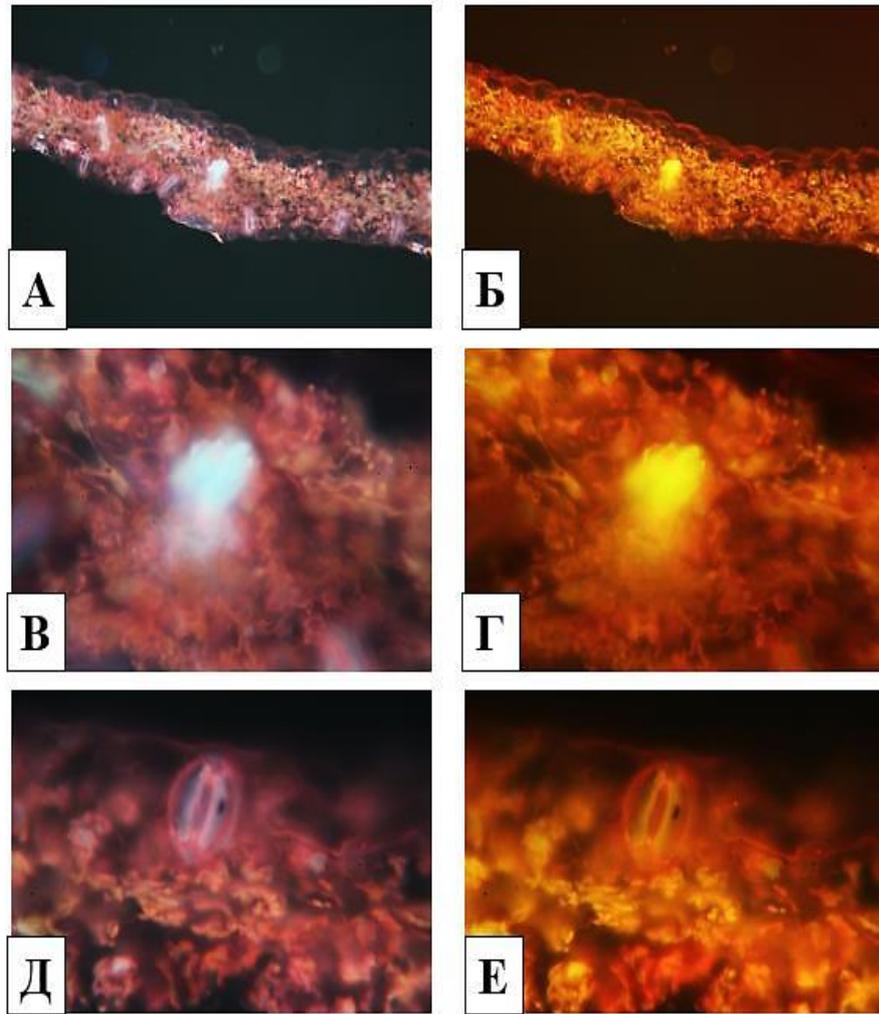


Рисунок 3 – Люминесценция поперечных срезов листовой пластины чернушки посевной: А – общий вид при $\lambda=360$ нм (x100); Б – общий вид при $\lambda=420$ нм (x100); В – проводящий пучок при $\lambda=360$ нм (x400); Г – проводящий пучок при $\lambda=420$ нм (x400); Д – устьице при $\lambda=360$ нм (x400); Е – устьице при $\lambda=420$ нм (x400)

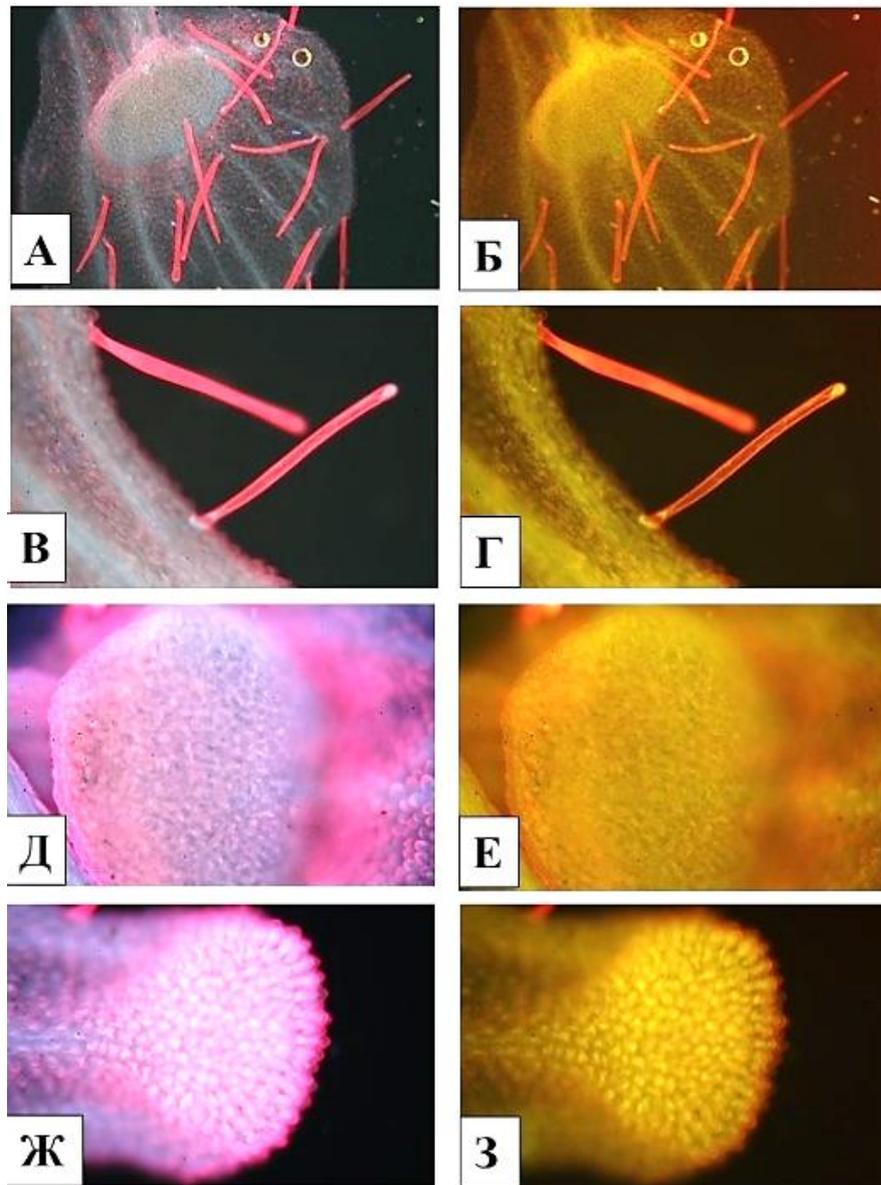


Рисунок 4 – Люминесценция верхней губы нектарника чернушки посевной:
 А – фрагмент губы при $\lambda=360$ нм (x40); Б – фрагмент губы при $\lambda=420$ нм (x40); В – трихомы при $\lambda=360$ нм (x100); Г – трихомы при $\lambda=420$ нм (x400);
 Д – нектароносная ямка при $\lambda=360$ нм (x100); Е – нектароносная ямка при $\lambda=420$ нм (x100); Ж – кончик губы при $\lambda=360$ нм (x100); З – кончик губы при $\lambda=420$ нм (x100)

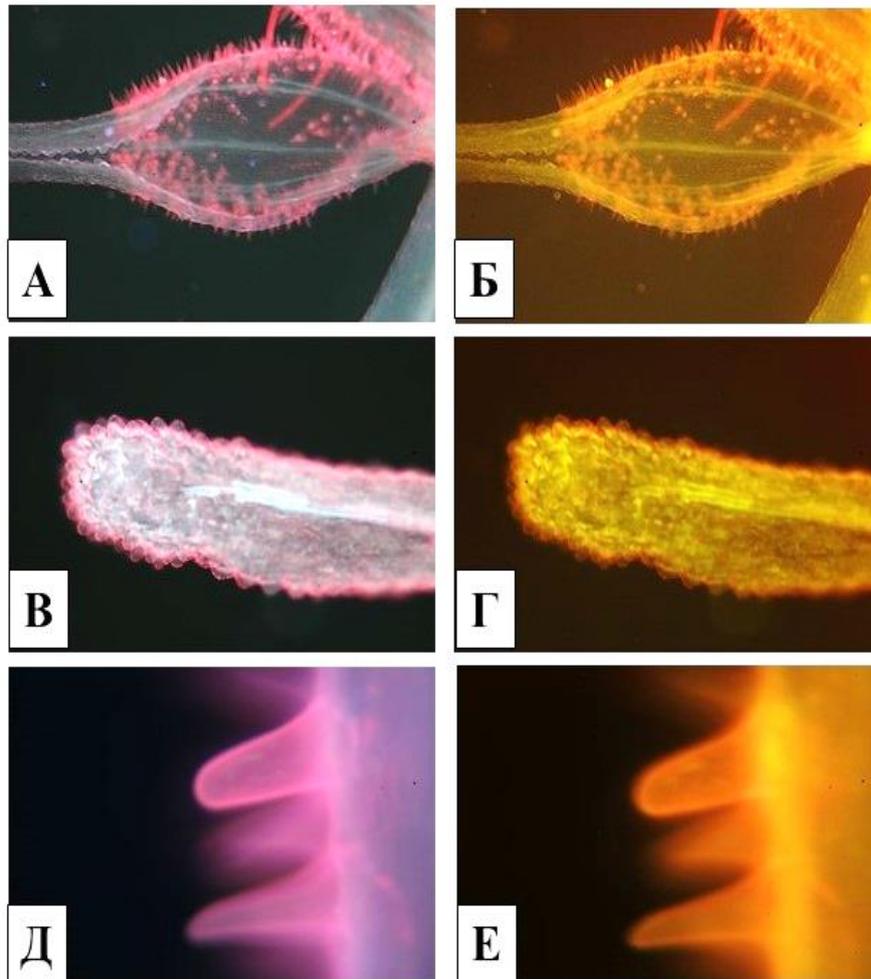


Рисунок 5 – Люминесценция нижней губы нектарника чернушки посевной:

А – фрагмент губы при $\lambda=360$ нм (x40); Б – фрагмент губы при $\lambda=420$ нм (x40); В – кончик губы при $\lambda=360$ нм (x100); Г – кончик губы при $\lambda=420$ нм (x100); Д – трихомы при $\lambda=360$ нм (x400); Е – трихомы при $\lambda=420$ нм (x400)

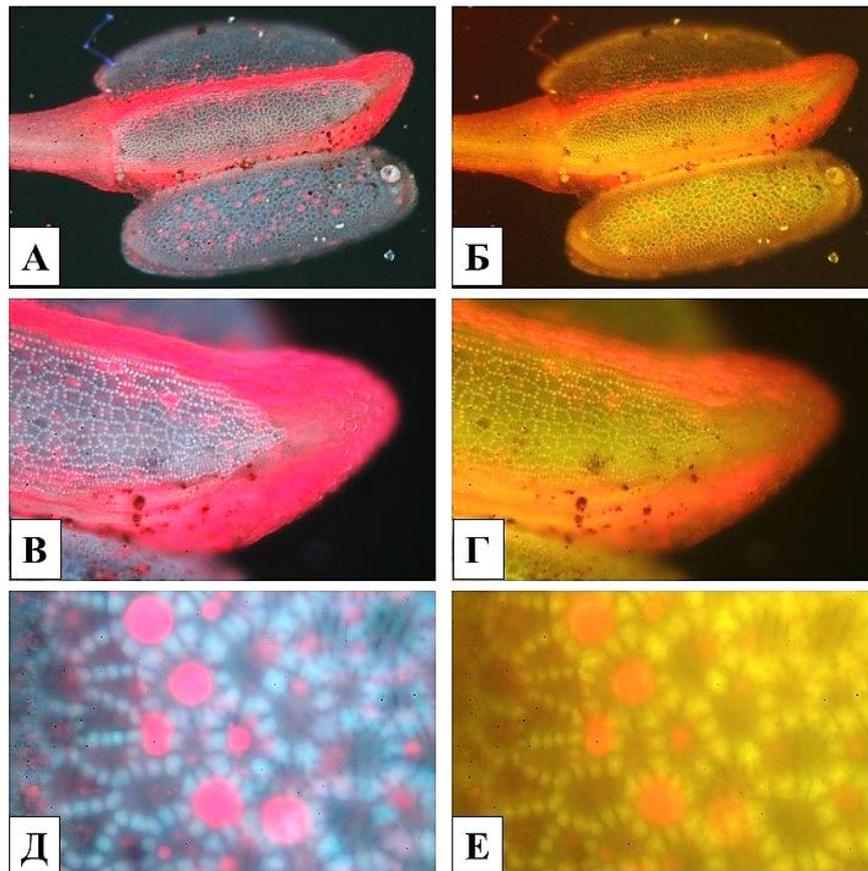


Рисунок 6 – Люминесценция тычинки чернушки посевной: А – пыльник при $\lambda=360$ нм (x40); Б – пыльник при $\lambda=420$ нм (x40); В – фрагмент пыльника со связником при $\lambda=360$ нм (x100); Г – фрагмент пыльника со связником при $\lambda=420$ нм (x100); Д – центральные клетки пыльника при $\lambda=360$ нм (x400); Е – фрагмент пыльника со связником при $\lambda=420$ нм (x400)

**Приложение 2. Результаты определения биоаккумуляции
суммы флавоноидов в траве чернушки посевной**

Таблица 1 – Данные определения биоаккумуляции суммы флавоноидов в траве ч. посевной
в течение вегетационного периода за 2020-2022 года

2020		2021		2022	
Время сбора сырья	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье в пересчёте на рутин, %	Время сбора сырья	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье в пересчёте на рутин, %	Время сбора сырья	Содержание суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье в пересчёте на рутин, %
28.05.20	2,51±0,20	29.05.21	2,35±0,22	-	-
04.06.20	2,30±0,23	05.06.21	2,11±0,22	04.06.22	2,48±0,28
25.06.20	2,15±0,26	26.06.21	2,01±0,21	25.06.22	2,26±0,29
04.07.20	1,80±0,21	03.07.21	1,60±0,23	06.07.22	1,69±0,24
26.07.20	1,53±0,22	24.07.21	1,25±0,19	24.07.22	1,12±0,21
08.08.20	1,25±0,21	08.08.21	1,18±0,25	07.08.22	1,72±0,22
28.08.20	0,90±0,24	28.08.21	0,82±0,21	27.08.22	1,01±0,19
04.09.20	0,80±0,22	05.09.21	0,75±0,18	11.09.22	0,69±0,11

**Приложение 3. Результаты ГХ-МС анализа
жирных масел чернушки посевной**

Таблица 1 – Сравнительный жирнокислотный анализ жирных масел чернушки посевной

№ п/п	Идентифицированные жирные кислоты	Время удерживания, мин	«Egyptian Black Seed Oil» (Египет), %	«Масло Королевское» (Египет), %	«Black seeds oil» (Пакистан), %	«Huile de Nigelle» (Саудовская Аравия), %	«Золото Эфиопии» (Египет), %
1.	<i>Миристиновая кислота (C_{14:0})</i>	12,56	0,05±0,003	0,04±0,002	0,07±0,005	0,25±0,02	0,06±0,004
2.	<i>Пентадециловая кислота (C_{15:0})</i>	13,91	0,01±0,001	-	-	-	-
3.	<i>Пальмитоолеиновая кислота (C_{16:1})</i>	15,12	0,06±0,004	0,08±0,005	0,08±0,006	-	0,07±0,005
4.	<i>Пальмитиновая кислота (C_{16:0})</i>	15,48	9,26±0,54	3,97±0,26	6,41±0,43	12,36±0,62	7,60±0,33
5.	<i>Гептадеценовая кислота (C_{17:1})</i>	16,73	0,01±0,002	-	-	-	-
6.	<i>Маргариновая кислота (C_{17:0})</i>	17,13	0,02±0,001	-	0,02±0,001	-	0,02±0,002
7.	<i>Линолевая кислота (C_{18:2})</i>	18,48	64,08±0,61	36,64±0,42	63,33±0,57	48,92±0,54	64,82±0,62

8.	<i>Олеиновая кислота (C_{18:1})</i>	18,58	23,32±0,33	55,84±0,58	26,56±0,34	31,53±0,42	24,09±0,33
9.	<i>11-октадеценовая кислота (C_{18:1})</i>	18,61	0,45±0,03	–	0,63±0,04	1,79±0,12	0,47±0,05
10.	<i>Линоленовая кислота (C_{18:3})</i>	18,69	-	0,24±0,02	0,02±0,001	-	-
11.	<i>Стеариновая кислота (C_{18:0})</i>	18,97	1,30±0,08	1,24±0,08	1,41±0,09	2,62±0,17	1,42±0,08
12.	<i>Эйкозодиеновая кислота (C_{20:2})</i>	22,09	0,87±0,05	0,19±0,01	0,61±0,04	1,48±0,09	0,73±0,04
13.	<i>11-эйкозеновая кислота (C_{20:1})</i>	22,17	0,10±0,01	0,24±0,02	0,12±0,01	-	0,10±0,01
14.	<i>Арахидиновая кислота (C_{20:0})</i>	22,64	0,06±0,04	0,16±0,01	0,09±0,006	-	0,07±0,005
15.	<i>Бегеновая кислота (C_{22:0})</i>	26,33	-	0,11±0,007	0,08±0,005	-	0,04±0,003

Приложение 4. Хроматограммы жирных масел чернушки посевной

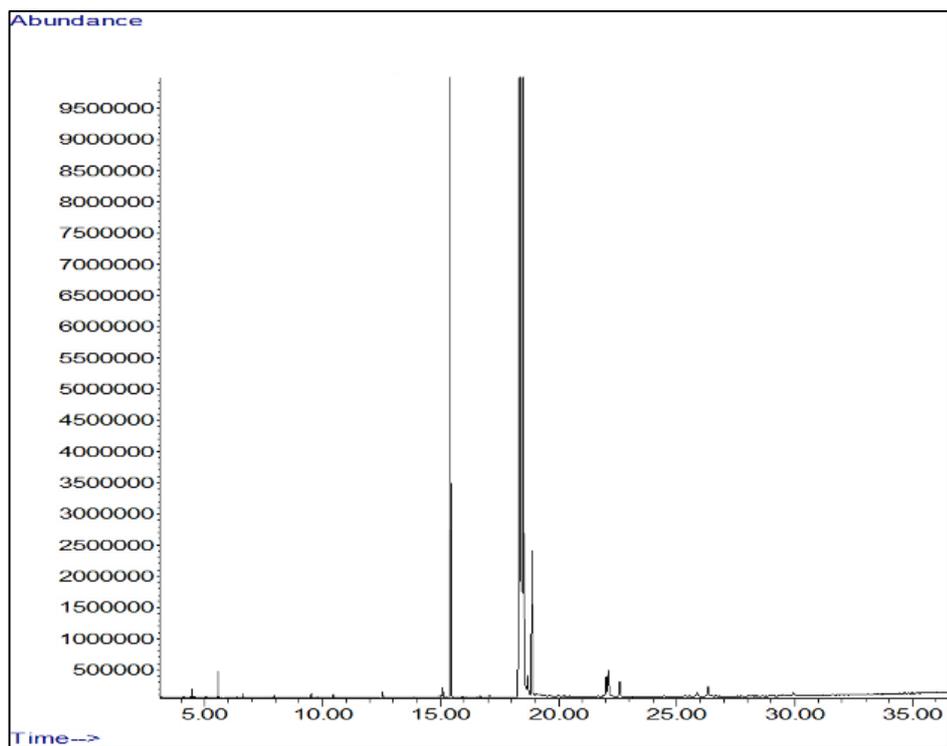


Рисунок 1 – Хроматограмма масла чернушки посевной №2 «Масло Королевское» (Египет)

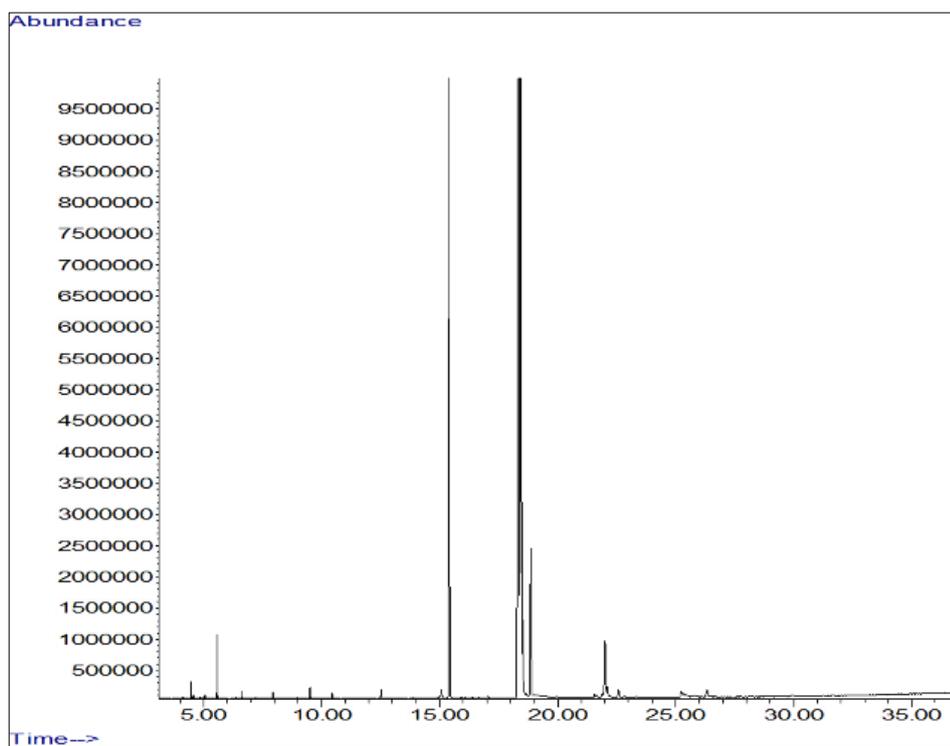


Рисунок 2 – Хроматограмма масла чернушки посевной №3 «Black seeds oil» (Пакистан)

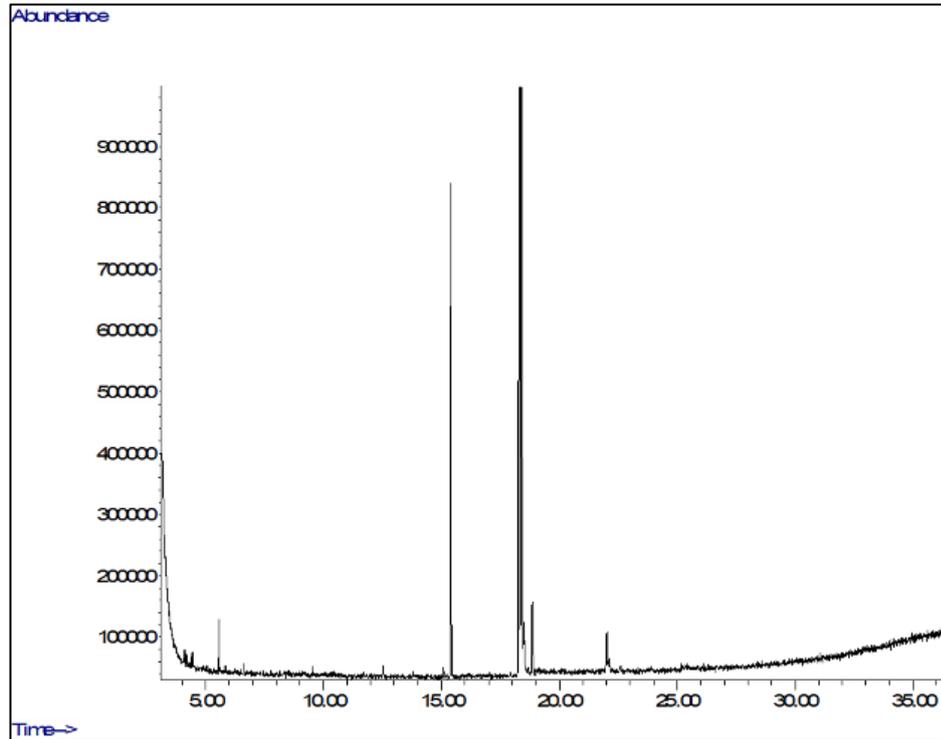


Рисунок 3 – Хроматограмма масла чернушки посевной №4 «Huile de Nigelle» (Саудовская Аравия)

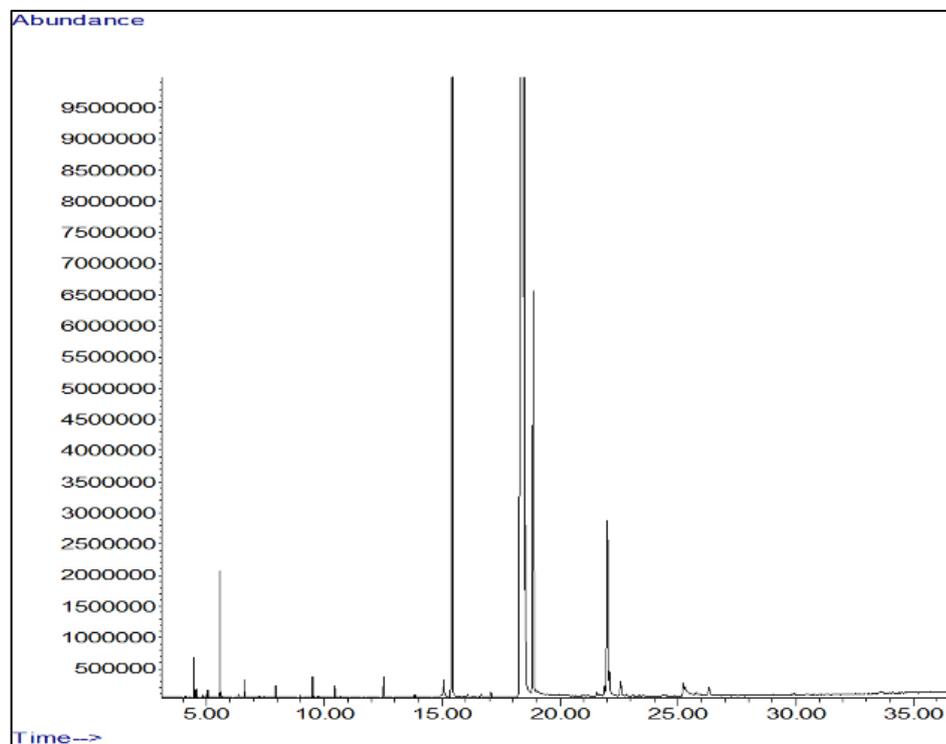


Рисунок 4 – Хроматограмма масла чернушки посевной №5 «Золото Эфиопии» (Египет)

«Утверждаю»


 Генеральный директор
 ЗАО «Самаралектравы»

Н.Д. ЛУЖНОВ

10 июля 2022 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Мубинова Артура Рустемовича «Фармакогностическое исследование чернушки посевной (*Nigella sativa* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) в ЗАО «Самаралектравы»

Комиссия в составе сотрудников ЗАО «Самаралектравы» зав. производством ЗАО «Самаралектравы» А.Н. Загорянского, главного инженера А.В. Никитенкова подтверждает использование материалов диссертационного исследования Мубинова А.Р., посвящённого исследованию химического состава, а также разработке методик анализа сырья чернушки посевной, определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации нового вида лекарственного растительного сырья – «Чернушки посевной трава» и лекарственного растительного препарата – «Чернушки посевной травы настойка» в работе предприятия.

Разработанные методики качественного и количественного анализа сырья чернушки посевной апробированы в процессе работы предприятия. Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации сырья и лекарственных препаратов на основе чернушки посевной.

Члены комиссии:

Заведующий производством ЗАО «Самаралектравы»

А.Н. ЗАГОРЯНСКИЙ

Главный инженер ЗАО «Самаралектравы»

А.В. НИКИТЕНКОВ

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
 ООО «Самарская фармацевтическая
 фабрика»

М.С. Глебов

Акт внедрения

Наименование предложения: Методики качественного и количественного определения содержания биологически активных соединений в лекарственном растительном сырье и препаратах чернушки посевной.

Кем предложено, адрес исполнителя: А.Р. Мубиновым, очным аспирантом кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 443099, г. Самара, ул. Чапаевская, 89.

Место внедрения: ООО «Самарская фармацевтическая фабрика», 446112, Самарская область, г. Чапаевск, ул. 1-ая Монтажная, д. 12а, офис 5.

Результаты внедрения: Разработанные методики качественного и количественного анализа биологически активных соединений в лекарственном растительном сырье и препаратах чернушки посевной предусматривают проведение морфолого-анатомического анализа, ТСХ и УФ-спектроскопии, ВЭЖХ с использованием стандартных образцов. Методики определения подлинности сырья и препаратов на основе сырья чернушки посевной воспроизводимы и удобны в работе. Разработанные подходы способствуют стандартизации ЛРС и препаратов на этапах приемки, производства и хранения; также имеется научное обоснование целесообразности использования лекарственных препаратов на основе чернушки посевной.

Главный технолог
 ООО «Самарская фармацевтическая фабрика»

 Д.С. Зуев

« 27 » 09 2022 г.



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Лекарь»

Д.Ю. Бобров

2022 г.

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

результатов диссертационной работы Мубинова Артура Рустемовича
«Фармакогностическое исследование чернушки посевной (*Nigella sativa* L.)» на соискание
ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2.
Фармацевтическая химия, фармакогнозия в ООО «Лекарь»

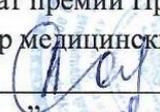
Результаты диссертационной работы Мубинова А.Р., посвященные фармакогностическому исследованию чернушки посевной (*Nigella sativa* L.), разработке методик количественного содержания биологически активных соединений, а также обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и препаратов на основе чернушки посевной имеют широкое практическое применение. Методологические подходы, предусматривающие использование морфолого-анатомического анализа, ТСХ и УФ-спектрофотометрии с использованием стандартных образцов лежат в основе разработанных методик. Методики определения подлинности, качественного и количественного суммы флавоноидов в траве чернушки посевной воспроизводимы и удобны в работе.

Таким образом, результаты диссертационной работы Мубинова А.Р., посвященные фармакогностическому исследованию чернушки посевной (*Nigella sativa* L.), используются в рабочем процессе ООО «Лекарь» и способствуют стандартизации ЛРС на этапах приемки, производства и хранения; научному обоснованию и целесообразности использования лекарственных препаратов на основе чернушки посевной.

Главный технолог
ООО «Лекарь»

«24» 05 2022 г.

“Утверждаю”

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук, профессор
 И.Л. Давыдкин
“ 10 ” февраля 2022 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы
Мубинова Артура Рустемовича «Фармакогностическое исследование чернушки
посевной (*Nigella sativa* L.)» на соискание ученой степени кандидата
фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия,
фармакогнозия (фармацевтические науки) на кафедре фармакогнозии с ботаникой
и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармакогнозии с ботаникой и
основами фитотерапии: зав. кафедрой, д.фарм.н., профессора Куркина В.А.,
профессора кафедры, д.фарм.н., доцента Правдивцевой О.Е., доцента кафедры,
к.фарм.н., доцента Рыжова В.М. подтверждает использование материалов
диссертационного исследования Мубинова А.Р., посвященного изучению
вопросов фитохимической и морфолого-анатомической диагностики,
обоснованию подходов к стандартизации лекарственного сырья и препаратов на
основе травы и масла из семян чернушки посевной (*Nigella sativa* L.) в учебном
процессе при проведении практических занятий со студентами и ординаторами, а
также в научно-исследовательской работе. Внедренные результаты способствуют
повышению объективности стандартизации лекарственного растительного сырья.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
д. фарм. н., профессор

 В.А. Куркин

Профессор кафедры фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
д. фарм. н., доцент

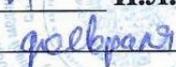
 О.Е. Правдивцева

Доцент кафедры фармакогнозии
с ботаникой и основами фитотерапии
к. фарм. н., доцент

 В.М. Рыжов

“Утверждаю”

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук, профессор


И.Л. Давыдкин
“ 3 ”  2022 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы
Мубинова Артура Рустемовича «Фармакогностическое исследование
чернушки посевной (*Nigella sativa* L.)» на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2.
Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) на
кафедре химии Института фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры химии Института фармации:
зав. кафедрой, д.фарм.н., доцента Воронина А.В., доцента кафедры, к.хим.н.,
доцента Шариповой С.Х., доцента кафедры, к.биол.н., доцента
Расцветовой Н.В. подтверждает использование материалов диссертационного
исследования Мубинова А.Р., посвященного изучению химического состава,
определению диагностических признаков и обоснованию подходов к
стандартизации лекарственного растительного сырья чернушки посевной
(*Nigella sativa* L.) в учебном процессе при проведении практических занятий
со студентами, а также в научно-исследовательской работе в области изучения
лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды.

Внедренные результаты способствуют повышению объективности
стандартизации лекарственных препаратов на основе лекарственного
растительного сырья чернушки посевной.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой химии Института фармации,
д. фарм. н., доцент



А.В. Воронин

Доцент кафедры химии Института фармации,
к. хим. н., доцент



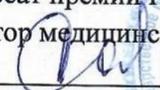
С.Х. Шарипова

Доцент кафедры химии Института фармации,
к. биол. н., доцент



Н.В. Расцветова

“Утверждаю”

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук, профессор
 И.Л. Давыдкин
“ 20 ” декабря 2021 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы
Мубинова Артура Рустемовича «Фармакогностическое исследование
чернушки посевной (*Nigella sativa* L.)» на соискание ученой степени кандидата
фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия,
фармакогнозия (фармацевтические науки) на кафедре фармацевтической
технологии с курсом биотехнологий ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры фармацевтической технологии с курсом биотехнологий: зав. кафедрой, д.фарм.н., доцента Куркиной А.В., профессора кафедры, д.фарм.н., профессора Первушкина С.В., доцента кафедры, к.фарм.н., доцента Климовой Л.Д., подтверждает использование материалов научно-исследовательской работы Мубинова А.Р., посвященной изучению химического состава и обоснованию использования в медицине лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов на основе сырья чернушки посевной (*Nigella sativa* L.), в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами, а также в научно-исследовательской работе в области технологических исследований по производству лекарственных препаратов на основе данного растения.

Используемые при этом результаты изучения химического состава, а также разработанные подходы к стандартизации сырья являются методической и методологической основой для научного обоснования ресурсосберегающих технологий.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой фармацевтической технологии
с курсом биотехнологий
д. фарм. н., доцент

 А.В. Куркина

Профессор кафедры фармацевтической технологии
с курсом биотехнологий
д. фарм. н., профессор

 С.В. Первушкин

Доцент кафедры фармацевтической технологии
с курсом биотехнологий
к. фарм. н., доцент

 Л.Д. Климова

“Утверждаю”

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук, профессор

И.Л. Давыдкин

“ 20 ” декабря 2021 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы
Мубинова Артура Рустемовича «Фармакогностическое исследование
чернушки посевной (*Nigella sativa* L.)» на соискание ученой степени кандидата
фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия,
фармакогнозия (фармацевтические науки) на кафедре управления и экономики
фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры управления и экономики
фармации: зав. кафедрой, д.фарм.н., доцента Петрухиной И.К., профессора
кафедры, д.фарм.н., доцента Гладуновой Е.П., доцента кафедры, к.фарм.н.,
доцента Абдулмановой Е.Л., подтверждает использование материалов
исследования Мубинова А.Р., посвященного изучению химического состава и
разработке подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья
чернушки посевной в учебном процессе при проведении практических занятий со
студентами Института фармации, а также в научно-исследовательской работе.

Внедренные результаты способствуют научному обоснованию
целесообразности создания конкурентоспособных лекарственных препаратов,
обладающих антиоксидантным и противомикробным действием, в том числе
импортозамещающих препаратов.

Члены комиссии:

Зав. кафедрой управления
и экономики фармации
д. фарм. н.



И.К. Петрухина

Профессор кафедры управления
и экономики фармации
д. фарм. н.



Е.П. Гладунова

Доцент кафедры управления
и экономики фармации
к. фарм. н.



Е.Л. Абдулманова

**Приложение 6. Патент на изобретение
«Способ количественного определения суммы
флавоноидов в траве чернушки посевной»**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2786440

**СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ ЧЕРНУШКИ
ПОСЕВНОЙ**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
"Самарский государственный медицинский университет"
Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Мубинов Артур Рустемович (RU), Авдеева Елена
Владимировна (RU), Куркин Владимир Александрович (RU)*

Заявка № 2022105524

Приоритет изобретения **01 марта 2022 г.**

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **21 декабря 2022 г.**

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **01 марта 2042 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов



**Приложение 7. Проект фармакопейной статьи
«Чернушки посевной трава»**

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

УТВЕРЖДАЮ

Директор Центра фармакопеи и
международного сотрудничества
ФГБУ «Научный центр экспертизы
средств медицинского применения»,
доктор фармацевтических наук,
профессор

_____ **Е.И. САКАНЯН**

«__» _____ 20__ г.

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ**

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

Организация-разработчик: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Чернушки посевной
трава

ФС.2.5.
Вводится впервые

Nigellae sativae herba

Срок введения установлен
с «__» _____ 20__ г.
до «__» _____ 20__ г.

Собранная в фазу цветения высушенная трава культивируемого однолетнего травянистого растения чернушки посевной – *Nigella sativa* L., сем. лютиковые – *Ranunculaceae*.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Сырье рассматривается невооруженным глазом с помощью лупы ($\times 10$) или под микроскопом ($8\times$, $16\times$, $20\times$, $40\times$) в соответствии с разделом «Методы анализа лекарственного растительного сырья» (ГФ РФ XIV издания).

Цельное сырье. Цельные или частично измельчённые облиственные стебли до 30-50 см с пятичленными цветками. Листья 2-4 см, очередные, в основании стебля черешковые, а ближе к верхушке стебля сидячие или коротко-черешковые, дважды или трижды перисто-рассеченные на узколанцетные сегменты. Стебли многогранные, выражено опушенные, прямостоячие. Имеются верхушечные одиночные цветки. Цветки мелкие – 1,5-2 см, актиноморфные с простым околоцветником, обоеполые. Цветок имеет венчиковидную чашечку из 5 окрашенных, белых у основания и синими на конце, лепестковидных продолговатых чашелистиков – на вершине притупленных, к основанию суженных в короткую ножку. Лепестков в числе 5-8, представленных двугубыми мясистыми нектарниками сложной формы: верхняя губа имеет разделение на 2 равные части; нижняя губа – полая, роговидного вида, снабжена нектароносной ямкой. Тычинки многочисленные, плодолистики (пестики) в числе 3-5 штук.

Цвет листьев с верхней стороны темно-зеленый, с нижней стороны – светло-зеленый, стеблей – светло-зеленый, к основанию стебля – желто-зеленый, венчиковидная чашечка – 5 синих на концах и белых у основания чашелистиков, лепестки-нектарники – светло-жёлтого цвета. Запах слабый травянистый. Вкус водного-спиртового извлечения пряно-травянистый.

Измельченное сырье. Кусочки стеблей, листьев, а также цветков, проходящие сквозь сито с отверстиями 2 мм.

Цвет от тёмно- и светло-зеленого до желто-зеленого с синими редкими вкраплениями. Запах слабый травянистый. Вкус водного-спиртового извлечения пряно-травянистый.

Микроскопические признаки. Сырье исследуется с помощью микроскопа (40×, 100×, 400×) в соответствии с разделом «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья» (ГФ РФ XIV издания).

Цельное, измельченное сырье. При рассмотрении микропрепаратов листа с обеих сторон клетки эпидермиса должны быть с сильно извилистыми стенками. Устьица преимущественно расположены с нижней стороны листа, аномоцитного типа - окружены 4-5 околоустьичными клетками и погружены в ткани. Листовая пластинка имеет опушение - по краям листовой пластинки и вдоль крупных жилок с нижней стороны листа имеются двухклеточные каплевидные волоски. Они имеют крупную живую клетку в основании с заметным структурированным протопластом и конечную мертвую клетку. Снаружи волоски покрыты гладкой кутикулой, окрашивающейся раствором Судана III в розовый цвет. При ближайшем рассмотрении края листовой пластинки (×400) диагностируются мелкие зубцы.

Клетки эпидермиса стебля многоугольные по форме, без видимой извилистости. Устьица окружены 4-5 эпидермальными клетками (аномоцитного типа). Поверхность стебля имеет выраженное опушение, представленное двумя типами трихом: каплевидными двухклеточными и одноклеточными длинными волосками. Проводящая система стебля представлена открытыми коллатеральными пучками, расположенными по окружности, чередуясь по размеру. Пучки стебля локализованы по его ребрам. В ребрах стебля наблюдается несколько рядов уголкового колленхимы, которая отсутствует по остальной части окружности.

Клетки эпидермиса нижней части чашелистиков цветка извилистые, с большим количеством устьиц аномоцитного типа. Верхний эпидермис представлен утолщёнными клетками, к сужению листа - клетки эпидермиса становятся более ровными и вытянутыми. 2 типа волосков – каплевидные и длинные простые волоски, которые окрашиваются раствором Судана III.

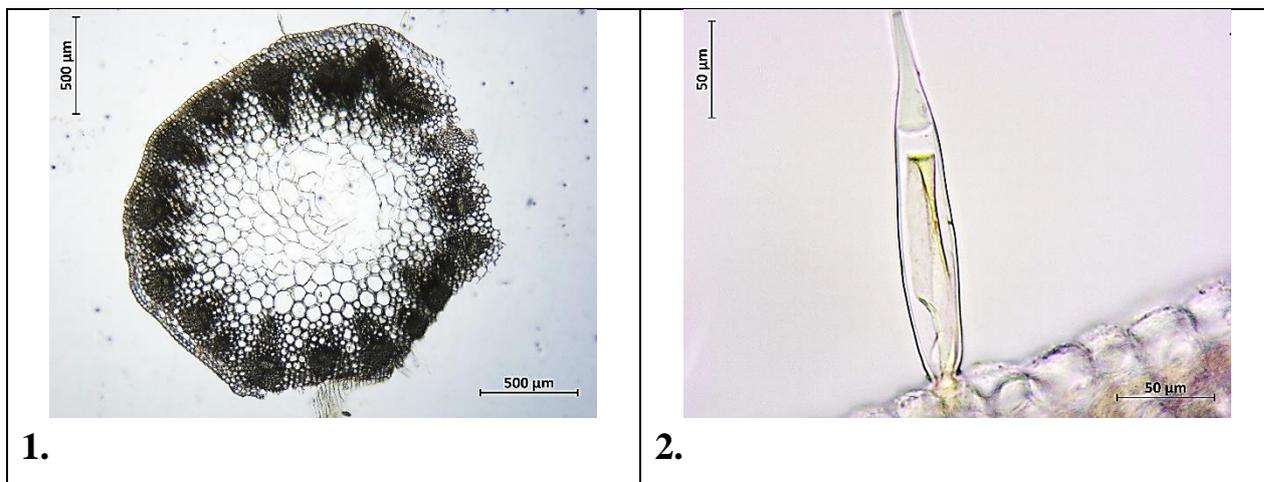
Нектарники цветка сложной формы, двугубые. Клетки эпидермиса верхней губы утолщены, имеют характерную извилистость. Верхняя губа имеет густое опушение длинными волосками, покрытыми толстой гладкой кутикулой, окрашиваемой в яркий красный цвет после обработки микропрепарата раствором Судана III. Имеется нектароносная ямка, клетки которой имеют яркий желтый цвет, кончик губы также имеет темно-желтую окраску. Нижняя губа нектарника имеет овалообразное тело основания с длинным кончиком, нектароносных клеток не наблюдается. Тело нижней губы имеет небольшие сосочковидные трихомы по поверхности, кутикула которых также окрашивается раствором Судана III.

Фертильная часть цветка представлена 5 сросшимися плодолистиками. Пестики располагаются в цветке открыто на цветоложе над лепестковидными чашелистиками. Рыльце пестика цельное, однолопастное. Поверхность завязи имеет опушение двумя типами трихом: многоклеточные округлые железки и каплевидные простые волоски. Под трихомами наблюдается слой клеток, имеющий особую гранулярную структуру протопласта, нативно – зелёного цвета, которые при обработке раствором Судана III окрашиваются в розовый цвет. Цветок имеет множество свободных тычинок. Тычинки с хорошо заметными пыльниками с длинными тычиночными нитями, располагающимися открыто на цветоложе над лепестковидными чашелистиками. Пыльники имеют овальную форму, пыльцевые зерна многочисленные и имеют округлую форму размером около 50 мкм. Эпидермальные клетки тычиночной нити прямые, трихомы отсутствуют.

Форма поперечного среза черешка в базальной части – неправильная U-образная, вдавленная с адаксиальной стороны с ребрами, имеющими округлую форму и направленными к верхней стороне листа. Имеется характерное опушение черешка – каплевидные волоски с длинными простыми волосками на концах ребер черешка. Эпидермальные клетки черешка имеют слабоизвилистые очертания с аномоцитным устьичный аппаратом.

Проводящая система черешка представлена системой проводящих пучков в числе пяти. Крупный пучок центральной жилки закрытого коллатерального типа, в сторону ребер располагаются небольшие пучки аналогичного строения. Все пучки армированы и имеют характерную желтую окраску после обработки раствором сернокислого анилина.

При проведении люминисцентной микроскопии отмечаются следующие особенности свечения: при облучении трихом стебля и листьев УФ-светом с длиной волны 360 нм наблюдается выраженное светло-голубое до белого свечение. Проводящие элементы пучков имеют характерную люминесценцию при облучении УФ-излучением – ярко-синюю при $\lambda=360$ нм и желтую при $\lambda=420$ нм. Верхняя губа имеет яркое розовое свечение длинных трихом при $\lambda=360$ нм и красного цвета – при $\lambda=420$ нм. Нектароносная ямка и кончик верхней губы имеют схожую светимость при воздействии УФ-света: при $\lambda=360$ нм – голубое свечение по центру клеток и яркий розовый оттенок внешней оболочки кутикулы, при $\lambda=420$ нм – темно-оранжевого цвета с красно-оранжевым очертанием. Сосочкообразные трихомы нижней губы нектарника также имеют характерную люминесценцию: при $\lambda=360$ нм – розового цвета, при $\lambda=420$ нм – красного.



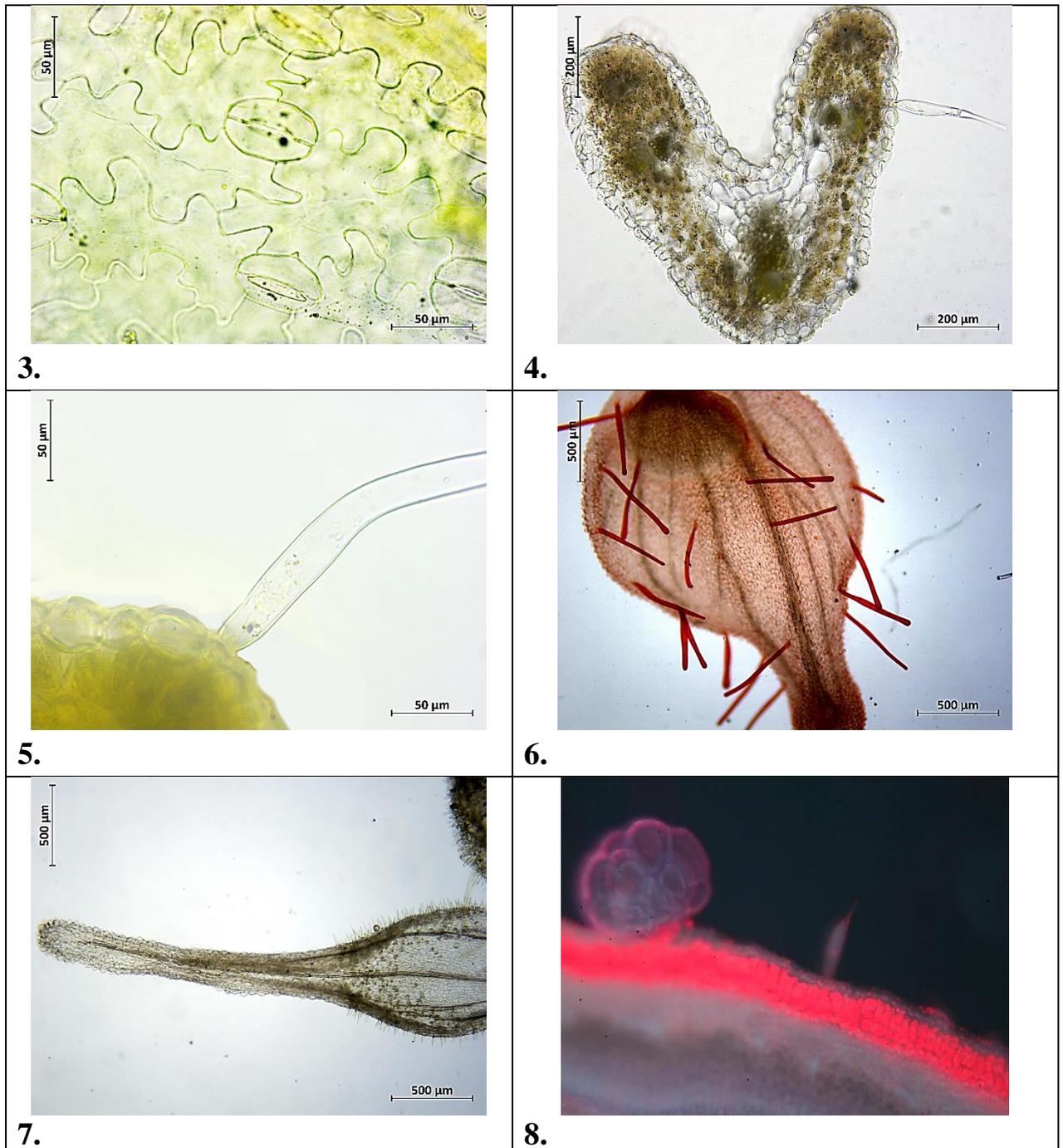


Рис. 1. Микроскопические признаки травы чернушки посевной

- 1 – фрагмент стебля ($\times 40$); 2 – каплевидный двухклеточный волосок;
 3 – эпидермис нижней стороны листа ($\times 400$); 4 – черешок листа ($\times 40$);
 5 – длинный простой волосок черешка ($\times 400$); 6 – фрагмент верхней губы,
 окраска раствором Судана III ($\times 40$); 7 – фрагмент нижней губы ($\times 40$);
 8 – трихомы завязи пестика при облучении светом с длиной волны $\lambda=360$
 нм ($\times 100$)

Определение основных групп биологически активных веществ:**1. Качественные реакции**

К 1 мл полученного извлечения, приготовленного как указано в разделе «Количественное определение», прибавляют 2 мл 3 % раствора алюминия (III) хлорида спиртового, через 20-30 минут появляется желтое окрашивание.

2. Тонкослойная хроматография

Раствор стандартного образца (СО) рутина. Около 0,005 г СО рутина растворяют в 10 мл спирта 70% и перемешивают. Срок годности раствора 1 мес. при хранении в прохладном, защищенном от света месте.

Хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» или «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ» заранее активируют в сушильном шкафу при температуре 105°C в течение 60 минут.

На линию старта аналитической хроматографической пластики со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемого раствора травы чернушки посевной и параллельно 20 мкл раствора СО рутина. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 минут, помещают в камеру, предварительно насыщенную не менее 60 минут смесью растворителей хлороформ – этиловый спирт – вода (25:18:2) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителя пройдет около 80-90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителя, обрабатывают 3% спиртовым раствором алюминия хлорида, сушат в сушильном шкафу при температуре 100-105 °С в течение 3-5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 365 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: зона адсорбции с желто-зеленой флуоресценцией на уровне адсорбции СО рутина со значением R_f около 0,40, зона адсорбции с зеленой флуоресценцией со значением R_f около 0,48 (никотифлорина). Допускается наличие других пятен меньшей интенсивности свечения. Величина

коэффициента R_{st} (отношение коэффициента удерживания никотифлорина к коэффициенту удерживания рутина) должна лежать в пределах 1,15-1,25.

2. УФ-спектроскопия

Испытуемый раствор, приготовленный как указано в разделе «Количественное определение», имеет максимум на дифференциальной кривой поглощения при длине волны 410 ± 2 нм (рис. 2, 3).

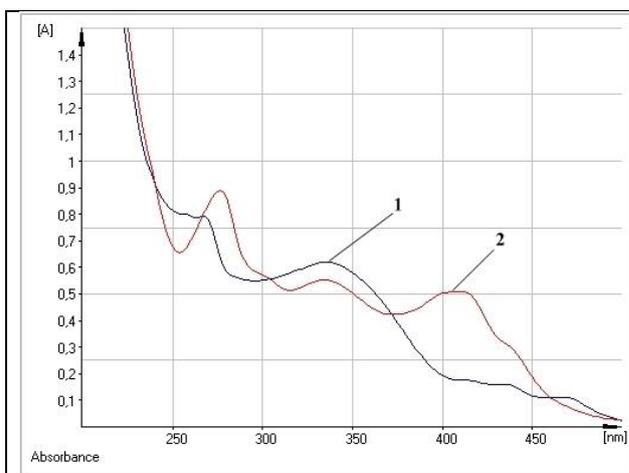


Рис. 2. Кривая поглощения раствора водно-спиртового извлечения из травы чернушки посевной:
1 – исходный раствор;
2 – в присутствии $AlCl_3$

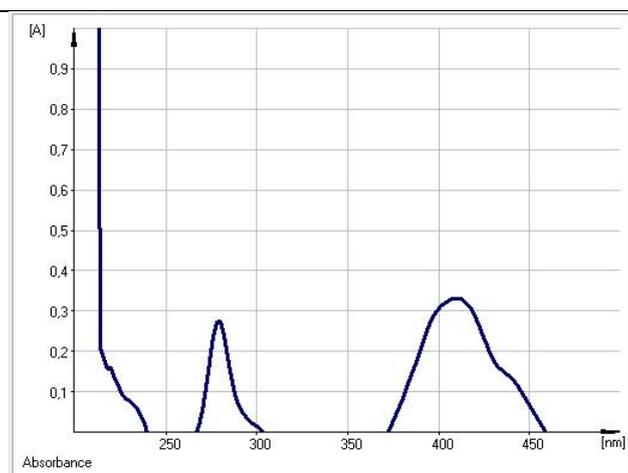


Рис. 3. Дифференциальная кривая поглощения раствора водно-спиртового извлечения из травы чернушки посевной

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. Цельное сырье, измельченное сырье – не более 12 %.

Зола общая. Цельное сырье, измельченное сырье – не более 13 %.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. Цельное сырье, измельченное сырье – не более 3 %.

Измельченность сырья. Цельное сырье: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 1 мм, - не более 5%. Измельченное сырье: частиц, не проходящих сквозь сито размером 7 мм - не более 5%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстием размером 0,5 мм, - не более 5%.

Посторонние примеси.

Стеблей. Цельное, измельченное сырье – не более 60%.

Сырьё, изменившее окраску (пожелтевшее и почерневшее). Цельное сырье – не более 3 %.

Органическая примесь. Цельное, измельчённое сырье – не более 3 %.

Минеральная примесь. Цельное, измельчённое сырье – не более 1,5 %.

Тяжелые металлы. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (ГФ РФ XIV издания).

Микробиологическая чистота. В соответствии с ОФС «Микробиологическая чистота» (ГФ РФ XIV издания).

Количественное определение. Цельное сырье, измельченное сырье: суммы флавоноидов в пересчете на рутин - не менее 1,0 %.

Приготовление раствора алюминия хлорида спиртового 3 %. 3 г алюминия хлорида помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл, растворяют в спирте 96 % и доводят объём раствора тем же спиртом до метки. Срок годности раствора 3 мес.

Приготовление раствора СО рутина. Около 0,02 г (точная навеска) рутина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 30 мл спирта 70% при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объём раствора спирта 70% до

метки (раствор А СО рутина). 2 мл раствора А рутина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом 96 % (раствор Б СО рутина).

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл спирта 70 %. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 45 мин. Затем ее охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр «красная полоса» (раствор А испытуемого раствора).

1,0 мл раствора А испытуемого раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом 96 % (раствор Б испытуемого раствора).

Оптическую плотность раствора Б испытуемого раствора измеряют через 40 минут после приготовления на спектрофотометре при длине волны 412 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения используют 1 мл раствора А испытуемого раствора, доведенный спиртом 96 % в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора Б СО рутина в тех же условиях. В качестве раствора сравнения используют 2 мл раствора А СО рутина, доведенный спиртом 96 % в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Содержание суммы флавоноидов (X в процентах) в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$x = \frac{A * m_0 * 30 * 25 * 2 * 100 * 100}{A_0 * m * 50 * 25 * (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора СО рутин;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса СО рутин, г;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Допускается содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин вычислять с использованием удельного показателя поглощения рутин при длине волны 412 нм, который равен 231:

$$x = \frac{A * 30 * 25 * 100}{m * 231 * (100 - W)},$$

где A – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, г;

231 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) СО рутин при 412 нм;

W – потеря в массе при высушивании в процентах.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» (ГФ РФ XIV издания).

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Проректор по научной работе ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России, лауреат премии Правительства
РФ, доктор медицинских наук, профессор



И.Л. Давыдкин

« _____ » _____ 2022

Заведующий кафедрой фармакогнозии с ботаникой
и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России, доктор фармацевтических
наук, профессор

В.А. Куркин

«26» 12 2022

Профессор кафедры фармакогнозии с ботаникой и
основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России, доктор фармацевтических
наук, профессор

Е.В. Авдеева

«26» 12 2022

Очный аспирант кафедры фармакогнозии с
ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО
СамГМУ Минздрава России

А.Р. Мубинов

«26» 12 2022