

*На правах рукописи*

**САВЕЛЬЕВА АННА ЕВГЕНЬЕВНА**

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БАРХАТЦЕВ  
ОТКЛОНЕННЫХ (*TAGETES PATULA L.*)**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Самара – 2023

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный руководитель:**

доктор фармацевтических наук, доцент **Куркина Анна Владимировна**

**Официальные оппоненты:**

**Шмыгарева Анна Анатольевна** – доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии, заведующий кафедрой;

**Белоногова Валентина Дмитриевна** – доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии, заведующий кафедрой.

**Ведущая организация:** федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Курск.

Защита состоится «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г. в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета 21.2.061.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке по адресу: 443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171 и на сайте (<http://www.samsmu.ru/scientists/science/referats/2023/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «\_\_\_\_\_» \_\_\_\_\_ 2023 г.

**Ученый секретарь диссертационного совета,**  
кандидат фармацевтических наук, доцент

**Жданова Алина Валитовна**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** В Приказе МЗ РФ от 13.02.2013 г. № 66 «Об утверждении Стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года», а также проектом распоряжения Правительства РФ «Стратегии развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года» – важнейшим направлением является создания отечественных препаратов на замену импортных лекарственных средств (ЛС). Немаловажной задачей этого проекта является увеличение экспорта российской фармацевтической продукции, поиск новых действующих веществ и их источников, а также создание отечественных инновационных и высокоэффективных ЛС.

Лекарственное растительное сырье (ЛРС) широко используется в современной фармацевтической промышленности для получения целого ряда лекарственных растительных препаратов, эффективных и характеризующихся при грамотном применении минимальным побочным действием. Данная группа препаратов зарекомендовала себя для лечения хронических заболеваний, требующих длительной терапии (Куркин В.А., 2019; Куркин В.А., Авдеева Е.В. и др., 2016; Самылина И.А., Яковлев Г.П., 2013; Киселева Т.Л., Смирнова Ю.А., 2009).

На сегодняшний день одной из актуальных задач фармации является поиск новых перспективных лекарственных растений. Одним из таких видов являются бархатцы отклоненные (*Tagetes patula* L.).

Бархатцы отклоненные – представитель рода Бархатцы (*Tagetes* L.) семейства Астровые (*Asteraceae*), или Сложноцветные (*Compositae*). Это однолетнее травянистое растение, достигающее до 80 см в высоту, цветущее в июле-августе. Цветки бархатцев отклоненных широко используются в различных сферах народного хозяйства (пищевой, парфюмерно-косметической, парафармацевтической промышленности), а также имеется существенный опыт применения в народной медицине. Родиной бархатцев отклоненных является Мексика. Бархатцы отклоненные выращивают во всем мире в качестве неприхотливого, обильно цветущего декоративного растения, в том числе на территории Российской Федерации.

Интерес к бархатцам связан также с многообразием его сортовых форм. Однако имеющиеся на данный момент научные работы не полностью охватывают всё разнообразие. Многие исследователи, в том числе зарубежные ученые, вовсе не указывают в исследованиях сортовую принадлежность объекта. Сравнительное изучение различных сортов бархатцев отклоненных позволит выбрать наиболее перспективные образцы с точки зрения содержания важнейших ведущих биологически активных соединений (БАС).

Бархатцы отклоненные не являются в настоящее время фармакопейным видом. Лекарственных препаратов в России на основе данного растения не зарегистрировано. В литературе для цветков бархатцев описаны такие фармакологические свойства, как антимикробное действие, ранозаживляющая и антиоксидантная активность. Известно, что растения рода Бархатцы являются источником таких биологически активных соединений, как: флавоноиды, простые фенолы, эфирное масло, витамины (каротиноиды) (Подгорная Ж.В., 2008; Червонная Н.М., 2017). В этой связи, бархатцы отклоненные представляют интерес, как потенциальное лекарственное растение.

**Степень разработанности темы.** В настоящее время растения рода *Tagetes* L., и в частности *T. patula* L., не являются официальными и не включены в действующую редакцию Государственной фармакопеи РФ.

В отечественной литературе описаны некоторые морфолого-анатомические признаки бархатцев отклоненных: проведены макроскопический и морфолого-анатомический анализ цветков (Подгорная Ж.В., 2008). Однако актуальными остаются обновление и уточнение имеющихся данных с применением современных методов исследования.

Исследования химического состава сырья бархатцев отклоненных в основном посвящены изучению БАС в цветках бархатцев отклоненных (Подгорная Ж.В., 2008;

Червонная Н.М., 2017). Основными группами действующих веществ в сырье названы каротиноиды, флавоноиды и эфирное масло. Разработанные методики регламентируют количественное и качественное содержание суммы флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных (Подгорная Ж.В., 2008). Принимая во внимание трудоемкость в ходе проведения пробоподготовки (трехкратная экстракция сырья), большой объем вспомогательных операций, в том числе по упариванию и фильтрованию, считаем актуальным совершенствование методик анализа, как данного цветков, так и других частей растения (стебли, листья).

В плане изучения фармакологических свойств ранее отечественными и зарубежными авторами были определены антиоксидантная, ранозаживляющая и вазодилатирующая активность извлечения из цветков бархатцев отклоненных (Червонная Н.М., 2017; Chkhikvishvili I. и др., 2016; Faizi S. и др., 2011). Были установлены антибактериальные и противовирусные свойства извлечения из цветков, а также патулетина и патулитрина (Faizi S. и др., 2008). Таким образом, этот вид сырья является перспективным для получения на его основе растительных лекарственных препаратов, что подразумевает под собой необходимость проведения исследований безопасности препаратов на основе цветков бархатцев отклоненных, а также определения фармакологической активности отдельных, выделенных из данного сырья БАС.

Оставшаяся же после сбора соцветий надземная часть является малоизученной.

**Цель работы и основные задачи исследования.** Разработка подходов к стандартизации различных видов сырья бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.) и обоснование использования их в качестве источника новых эффективных лекарственных растительных препаратов – **цель** диссертационной работы.

Нами был поставлен ряд задач, необходимых для достижения цели диссертационной работы:

1. Анатомо-гистологический анализ соцветий бархатцев отклоненных.
2. Выделение диагностически значимых соединений из соцветий бархатцев отклоненных с их последующей идентификацией.
3. Выделение и идентификация диагностически значимых соединений из травы бархатцев отклоненных.
4. Разработка подходов к качественному анализу соцветий бархатцев отклоненных методом ТСХ.
5. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в соцветиях *Tagetes patula* L. методом дифференциальной спектрофотометрии.
6. Разработка методики количественного определения диагностически значимых соединений в соцветиях *Tagetes patula* L. с использованием ВЭЖХ.
7. Изучение флавоноидного состава травы бархатцев отклоненных и разработка методики количественного определения данной группы веществ.
8. Изучение острой токсичности, нейротропной и диуретической активности густого экстракта из соцветий бархатцев отклоненных, а также выделенных из данного вида сырья индивидуальных веществ.
9. Разработка проекта фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Бархатцев отклоненных цветки».

**Научная новизна.** Определены основные морфолого-анатомические диагностические признаки соцветий бархатцев отклоненных методами световой и люминесцентной микроскопии.

В ходе изучения химического состава соцветий бархатцев отклоненных впервые выделены такие вещества, как  $\beta$ -амирин, 3,5,7,4'-тетрагидрокси-6-метоксифлавонол (6-метоксикемпферол) и его гликозид – 7-O- $\beta$ -D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-6-метоксифлавонола. Из травы бархатцев отклоненных впервые выделены 3-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозид-7-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-6-метоксифлавонола, 3-O- $\beta$ -D-ксилопиранозид-7-O- $\alpha$ -L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-6-метоксифлавонола, 3-O- $\beta$ -D-

ксилопиранозид-7-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона, кемпферол (3,5,7,4'-тетрагидроксифлавон), кверцитрин (3-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона), изокверцитрин (3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона), а также 3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид лупеола и 3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид  $\beta$ -амирина. Для перечисленных веществ были описаны спектральные характеристики  $^1\text{H}$ -ЯМР- и  $^{13}\text{C}$ -ЯМР-спектров, получены результаты масс-спектрметрического анализа.

Впервые разработаны методики проведения ТСХ-анализа соцветий бархатцев отклоненных, количественного анализа суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных в пересчете на патулитрин и абсолютно сухое сырье, определения содержания патулитрина в соцветиях бархатцев отклоненных методом ВЭЖХ, количественного анализа суммы флавоноидов в траве бархатцев отклоненных в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье.

Патент Российской Федерации на изобретение – подтверждение научной новизны диссертационной работы (Приложение №1).

**Теоретическая и практическая значимость.** В ходе проведения анатомо-гистологического анализа, в том числе с использованием световой и люминесцентной микроскопии, выявлены диагностические признаки наиболее значимые для диагностики соцветий бархатцев отклоненных: конусовидные одноклеточные волоски – папиллы на отгибе венчика язычкового цветка; гусенице-видные волоски с характерным пигментированным протопластом; млечные каналцы с пигментированным млечным соком в структуре жилок трубки венчика язычковых цветков; простые вытянутые волоски с волнистыми стенками на отгибе венчика трубчатого цветка; вееровидная форма рыльца пестика у язычковых цветков, загибающаяся к основанию; лизигенные вместилища в обертках соцветий; гиподермальный слой склеренхимных волокон оберток соцветий; армированные коллатеральные пучки с тремя рядами ксилемных сосудов на поперечном сечении оберток соцветий.

Для соцветий бархатцев отклоненных выделены и описаны доминирующие и диагностически значимые флавоноиды – патулетин и патулитрин. Установлено, что именно патулитрин вносит вклад в спектральные характеристики водно-спиртовых извлечений из соцветий бархатцев отклоненных. Разработаны методики анализа данного вида растительного сырья, включающие в себя определение именно этого флавоноида с использованием метода ВЭЖХ. Были выделены из данного вида сырья и БАС, ранее не описанные для данного растения: сапонины, основным компонентом которых является  $\beta$ -амирин, а также флавоноиды 6-метоксикемпферол и его 7-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид.

Впервые в РФ изучена надземная часть бархатцев отклоненных, оставшаяся после сбора соцветий. Выделены и идентифицированы основные флавоноиды данного вида сырья, представляющие собой дигликозиды кверцетина и кемпферола, описаны их спектральные характеристики. Впервые выделены и идентифицированы сапонины: 3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид лупеола и 3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид  $\beta$ -амирина.

Для густого экстракта соцветий бархатцев отклоненных подтверждены диуретическая и нейротропная активность. Определено, что флавоноиды соцветий – патулетин и патулитрин, также способны оказывать диуретическое действие, для патулитрина установлено антидепрессантное действие.

**Внедрение результатов исследования.** Результаты диссертационного исследования интегрированы в образовательные и научно-исследовательские процессы кафедр Института фармации Самарского государственного медицинского университета (акты внедрения от 02.03.2022, 14.09.2022 и 15.09.2022 гг.). Кроме того, разработанные методики анализа соцветий и травы *Tagetes patula* L. апробированы и используются в производственных процессах на предприятиях ООО «Лекарь» и ООО «Самарская фармацевтическая фабрика», ЗАО «Самаралектравы», ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области» (акты внедрения от 27.09.2022, 22.02.2022 и 02.03.2022) (Приложение № 2).

**Личный вклад автора.** Все результаты исследований, описанные в диссертационной работе, были получены автором. По результатам анатомо-гистологического анализа установлены диагностические признаки сырья бархатцев отклоненных. Проведено фитохимическое исследование соцветий и оставшейся после их сбора надземной части. Выделены и идентифицированы 17 индивидуальных веществ из изученных объектов.

Изучен компонентный состав соцветий и травы бархатцев отклоненных. Разработаны методики качественного и количественного анализа для данного вида сырья и реализовано сравнительное исследования содержания групп действующих веществ в различных сортах *Tagetes patula* L.

Изготовлен густотой экстракт соцветий бархатцев отклоненных, который проверен на острую токсичность, и для которого проведены опыты по определению фармакологической активности. На наличие диуретического действия изучены выделенные из соцветий флавоноиды – патулетин и патулитрин, последний также исследован на наличие нейротропной активности.

Разработан проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Бархатцев отклоненных цветки».

**Связь задач исследования с планами научно-исследовательских работ.** Выполнение диссертационной работы осуществилось с учетом плана научно-исследовательских работ Самарского государственного медицинского университета, а именно в рамках выполнения темы НИОКР: «Химико-фармацевтические, биотехнологические, фармакологические и организационно-экономические исследования по разработке, анализу и применению фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов» (регистрационный номер: АААА-А19-119051490148-7, Дата регистрации: 14.05.2019 г.).

**Методология и методы исследования.** Методология диссертационной работы базируется на углубленном и детальном изучении, а также систематизации литературных данных о фармакогностических исследованиях различных морфологических органов бархатцев отклоненных, оценке актуальности и степени разработанности выбранной темы исследования.

Была поставлена цель работы, сформулированы необходимые для ее выполнения задачи, а также составлен план выполнения диссертационного исследования, выбраны объекты и методы исследования.

Объектами данного исследования являлись соцветия и трава бархатцев отклонённых различных сортовых форм, культивируемых в Самарской области. Сырье было заготовлено в Ботаническом саду Самарского университета (г. Самара). Помимо цельных и измельченных видов сырья использовались водно-спиртовые извлечения из них. Исследование проводили с использованием современных методов исследования, таких как цифровая и люминесцентная микроскопия, различные виды хроматографий (тонкослойная, колоночная, высокоэффективная жидкостная), УФ-спектрометрии, масс-спектрометрии, ЯМР-спектрокопии, фармакологического метода.

Математическую обработку полученных данных осуществляли с применением программного обеспечения в соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации XIV издания.

**Степень достоверности научных положений** основана на большом объеме экспериментального материала, полученного с использованием современных методов исследования, корректностью обработки информации, использования актуальных и проверенных источников информации. Обработка результатов исследований проведена с использованием математических методов анализа данных.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Основные положения, описанные в диссертационном исследовании, соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) по следующим направлениям исследования:

– «Формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств»;

– «Разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления»;

– «Изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе».

#### **Основные положения, выдвигаемые на защиту:**

1. Результаты анатомо-гистологического исследования соцветий бархатцев отклоненных.

2. Результаты исследования компонентного состава соцветий и травы бархатцев отклоненных, в том числе выделение и идентификация индивидуальных соединений.

3. Данные исследования по разработке подходов к качественному анализу соцветий бархатцев отклоненных методом тонкослойной хроматографии.

4. Результаты разработки методики количественного содержания суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.) в пересчете на патулитрин и абсолютно сухое сырье.

5. Результаты разработки методики качественного и количественного определения патулитрина в соцветиях *T. patula* L. методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

6. Результаты разработки методики количественного содержания суммы флавоноидов в траве бархатцев отклоненных методом дифференциальной спектрофотометрии в пересчете на рутин.

7. Результаты исследования фармакологической активности густого экстракта, патулетина и патулитрина соцветий бархатцев отклоненных.

8. Результаты подготовки проекта фармакопейной статьи «Бархатцев отклоненных цветки».

**Публикации.** По теме диссертационного исследования автором опубликовано 19 печатных работ, из них 1 статьи в журнале, индексируемом в Международной базе Scopus и 8 статей – в журналах, включенных ВАК в перечень рецензируемых научных изданий, в том числе 7 - в журналах, включенных в МБД. Получен патент РФ на изобретение (Приложение № 1).

**Апробация работы.** Полученные в результате диссертационного исследования данные были представлены на симпозиумах, научных и научно-практических конференциях различных уровней (областного, всероссийского и международного): X и XI международные симпозиумы «Фенольные соединения: свойства, активность, инновации» и «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (г. Москва, 2018 и 2022 гг.), Научно-практическая конференция с международным участием «Аспирантские чтения» (г. Самара, 2020, 2021 и 2022 гг.), Международные научные конференции «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения», «90 лет - от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы» и «От биохимии растений к биохимии человека» (г. Москва «ВИЛАР», 2020, 2021 и 2022 гг.), Международная научно-практическая конференция «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» (г. Томск, 2021 г.), Всероссийская научно-практическая онлайн-конференция с международным участием «Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы», посвященная 50-летию фармацевтического образования СамГМУ (г. Самара, 2021 г.), Всероссийская научно-практическая конференция студентов и молодых ученых с международным участием «Природные соединения и здоровье человека» (г. Иркутск, 2022 г.).

**Объем и структура работы.** Общий объем диссертационной работы составляет 160 страниц машинописного текста, на которых изложены ход и результаты исследования. В ее структуре содержатся 27 таблиц и 45 рисунков. Работа включает в себя введение, литературный обзор, объекты и методы исследования, четыре главы, представляющих результаты исследований, выводы и заключение, список литературы, состоящий из 120 источников, из которых 65 – на иностранном языке, а также приложение.

## **ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ**

В диссертационной работе проводили исследования соцветий и оставшейся наземной части (стебли и листья) бархатцев отклоненных 9 различных сортов, культивируемых в Самарской области.

В рамках диссертационной работы также исследованы водно-спиртовые извлечения (30, 40, 50, 60, 70, 80 и 96 % спирт) из соцветий и травы с использованием образцов сравнения, полученных на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России: рутин и кверцетин.

Анатомо-гистологический анализ проводили с использованием цифрового микроскопа марки ZEISS ZEN 2 и люминесцентного микроскопа «Альтами» ЛЮМ-2 (голубой и желтый светофильтры) с увеличениями x40, x100, x400.

Исследование растительного сырья проводили с использованием химических и физико-химических методов анализа. Для установления химического состава соцветий и травы бархатцев отклоненных был использован метод жидкостно-адсорбционной колоночной хроматографии; для разделения применялись силикагель марки L 40/100 мкм (Чехия), полиамид For Column Chromatography (Fluca Analytical, Германия). Спектральные характеристики выделенных индивидуальных веществ исследовали с помощью ЯМР <sup>1</sup>H-спектроскопии и ЯМР <sup>13</sup>C-спектроскопии с использованием спектрометров «JNM-ECX 400» (399.78 МГц) и «JNM-ECX 400» (100.52 МГц) соответственно. Масс-спектры высокого разрешения были зарегистрированы на приборе «Bruker micrOTOF II» методом электрораспылительной ионизации (ESI).

Для исследования извлечений изучаемых видов сырья и выделенных веществ использовали метод тонкослойной хроматографии с пластинками «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» (Россия). Спектрофотометрическое исследование проводили на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) в кюветах с толщиной слоя 10 мм в диапазоне длин волн от 190 нм до 700 нм. ВЭЖХ-анализ проводили с использованием хроматографа «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») с ультрафиолетовым детектором в следующих условиях: обращенная фаза, изократический режим, стальная колонка колонка КАХ-6-80-4 (№2; 2 мм x 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), подвижная фаза – ацетонитрил: 1% раствор уксусной кислоты в воде в соотношении 3:7, скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента – 2500 мкл. Детекцию веществ осуществляли с помощью УФ-детектора при длине волны 360 нм. Объемы инжестируемых проб: 4 мкл Аналитическая длина волны 360 нм.

Определяли наличие диуретического и нейротропного действия густого экстракта соцветий бархатцев отклоненных, а также выделенных из данного вида растительного сырья флавоноидов. Была исследована также острая токсичность густого экстракта.

## **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **1. Анатомо-гистологическое исследование соцветий бархатцев отклоненных.**

При рассмотрении с поверхности язычковых цветков в области отгиба венчика с адаксиальной (верхней) стороны эпидермис густо покрыт конусовидными одноклеточными



волосками – папиллами (рис. 1 А-1). Клеточные стенки папилл тонкие целлюлозные. В структуре протопласта в значительном количестве отмечаются жирные капли желтого или желто-оранжевого цвета, локализованные в основном у вершины папилл. При облучении выростов УФ-светом с  $\lambda=366$  нм отмечается различное свечение элементов протопласта. Жирные капли как правило люминесцируют тёмно-бурым или серо-желтым цветом, что характерно для пигментов группы каротина. Другие аморфные элементы протопласта люминесцируют голубым или светло-серым цветом, характерным для веществ фенольной природы.

Поверхность трубки венчика визуально более светлая. Эпидермальные клетки прямоугольной формы с заметно утолщенными целлюлозными клеточными стенками. Протопласт выражен слабо. При облучении УФ-светом с  $\lambda=366$  нм наблюдается слабое свечение в основном за счет кутикулы на поверхности (рис. 1, Б-2). На отгибе венчика с абаксиальной (нижней стороны) характер папилловидных выростов эпидермы иной. Клетки эпидермы округлые. Протопласт менее выражен. Люминесценция сине-голубого цвета при 366 нм в основном за счет клеточных стенок. Мелкозернистый пигментированный протопласт – при аналогичных условиях облучения люминесцирует розовым цветом (рис. 2, А-2)

В средней части лепестков венчика с абаксиальной (нижней стороны) эпидермальные клетки ровные без папилловидных выростов. Форма клеток прямоугольная со слабоволнистыми клеточными стенками. На поверхности эпидермы с абаксиальной стороны часто встречаются простые многоклеточные гусеницевидные волоски. Протопласты их клеток пигментированы желто-оранжевыми аморфными структурами, сохраняющими окраску при облучении УФ-светом с  $\lambda=366$  нм, а также УФ-светом с  $\lambda=420$  нм. Волнистая кутикула описанных трихом люминесцирует голубым цветом при 366 нм на фоне слабо светящихся клеток основной эпидермы (рис. 2, Б-2).

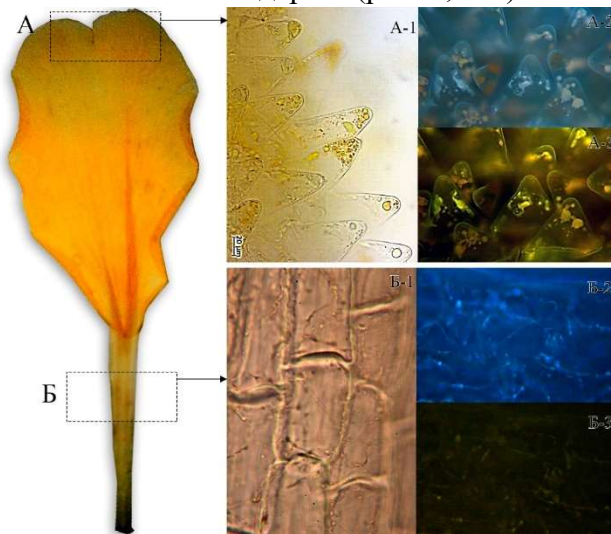


Рисунок 1 – Верхний эпидермис язычкового цветка: А – папиллы отгиба венчика, Б – клетки эпидермы трубки венчика.

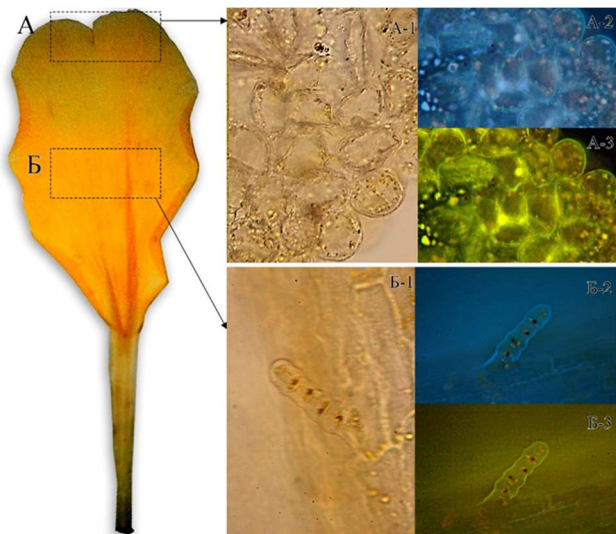


Рисунок 2 – Нижний эпидермис язычкового цветка: А – папиллы отгиба венчика, Б – простые многоклеточные гусеницеобразные волоски.

Обозначения: 1 – видимая область спектра, 2 – УФ-свет с  $\lambda=366$  нм, 3 – УФ-свет с  $\lambda=420$  нм.

Поверхность отгиба венчика трубчатого цветка с абаксиальной (верхней стороны) сложена из овальных по форме тонкостенных эпидермальных клеток. В структуре их протопласта хорошо заметны жирные капли красно-оранжевого цвета. При облучении УФ-светом с  $\lambda=366$  нм жирные капли светятся слабо, сохраняя яркую окраску (рис. 3, А-2).

Поверхность отгиба венчика значительно опушена простыми вытянутыми волосками. Клеточные стенки волосков тонкие волнистые с характерной голубой люминесценцией при

облучении УФ-светом с  $\lambda=366$  нм и желтой люминесценцией при 420 нм (рис. 3, Б-2, Б-3). Протопласты волосков аналогично папиллам на отгибе язычковых цветков имеют многочисленные пигментированные капли, сохраняющие цвет при облучении УФ-светом с  $\lambda=366$  нм.

В средней части венчика трубчатых цветков с адаксиальной стороны поверхность густо покрыта мелкими папиллами округло-конической формы. Характер пигментации протопласта и их люминесценция аналогичны таковым у волосков отгиба венчика.

С абаксиальной (нижней) стороны в области отгиба венчика опушение трихомами в основном локализовано по краю лепестков венчика, что хорошо заметно при рассмотрении синеголубой люминесценции волосков в УФ-свете с  $\lambda=366$  нм (рис. 4, А-2). Основная поверхность отгиба венчика не опушена и покрыта тонкостенными эпидермальными клетками овальной формы с большим количеством жирных капель красно-оранжевого цвета в протопласте (рис. 4, Б). Люминесценция клеток эпидермы абаксиальной стороны аналогична описанным выше клеткам отгибов венчика с верхней стороны (рис. 4, Б-2, Б-3).

Трубка венчика трубчатого цветка не пигментирована. Клетки эпидермы прямоугольные тонкостенные. Протопласт выражен слабо. Люминесценция проявляется не значительно в основном за счет кутикулы эпидермальных поверхностей.

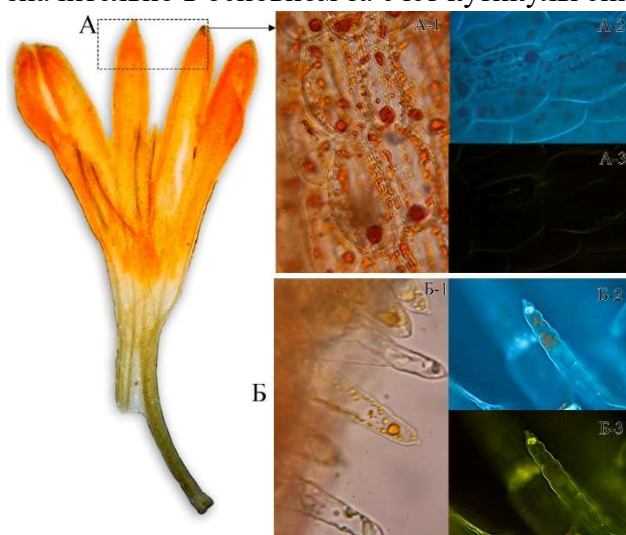


Рисунок 3 – Верхний эпидермис отгиба венчика трубчатого цветка: А – эпидермальные клетки отгиба венчика (x400), Б – простые волоски (x400).

Обозначения: 1 – видимая область спектра, 2 – УФ-свет с  $\lambda=366$  нм, 3 – УФ-свет с  $\lambda=420$  нм.

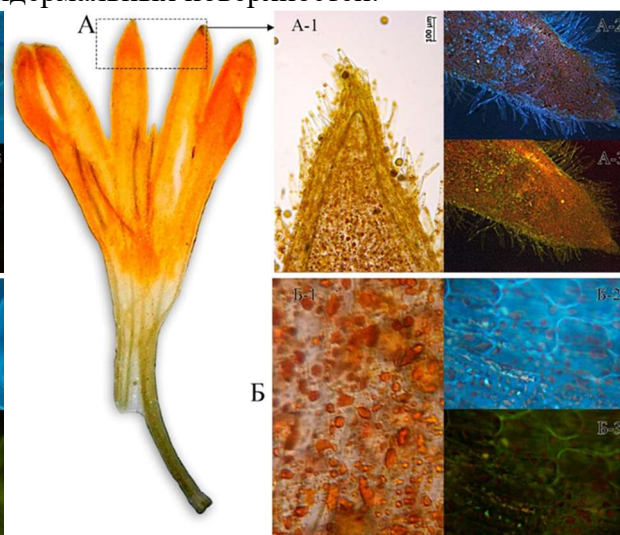


Рисунок 4 – Нижний эпидермис поверхности венчика трубчатого цветка: А – Опушение отгиба венчика (x100), Б – клетки эпидермы отгиба венчика (x400).

Обёртка соцветия, состоящая из сросшихся чашелистиков при рассмотрении с поверхности покрыта тонкостенным мелкоклеточным эпидермисом. На просвете эпидермальных клеток хорошо заметны склеренхима, расположенная армирующим гиподермальным слоем. Гиподермальный слой склеренхимы, при рассмотрении на поперечном сечении сложен из двух плотных слоёв склеренхимных волокон. Клеточные стенки волокон склерифицированы и имеют характерную люминесценцию.

Под эпидермисом на просвете хорошо заметны крупные светло-желтые вместилища овальной формы с жирными каплями оранжево-красной окраски, локализованные как правило по периферии вместилища. При облучении светом с  $\lambda=420$  нм жирные капли имеют ярко-оранжевую люминесценцию. На поперечном сечении видна лизигенная природа вместилищ. Их периферия сложена из остатков лизированных клеток мезофилла и люминесцирует светло-голубым цветом при облучении УФ-светом с  $\lambda=366$  нм.

В структуре мезофилла обёрток соцветия диагностируются проводящие пучки коллатерального типа. Со стороны флоэмной ткани пучки значительно армированы за счет группы лубяных волокон. Лубяные волокна широкопросветные, на поперечном сечении имеют неправильную угловатую форму без межклетников. Проводящие элементы ксилемы сгруппированы в три ряда сосудов, что имеет характерную картину пучка, специфическую для описанного вида.

## 2. Фитохимическое исследование соцветий и травы *Tagetes patula* L.

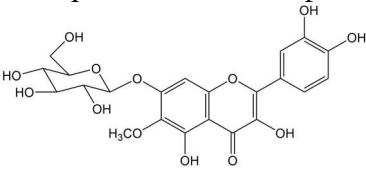
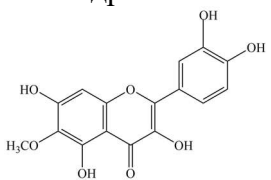
Предварительное сравнительное исследование различных сортовых форм соцветий бархатцев отклоненных методом тонкослойной хроматографии позволило выявить наличие флавоноидных структур в данном объекте, а также установить сходство качественного химического состава изучаемых объектов.

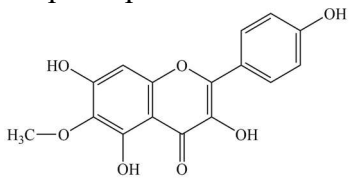
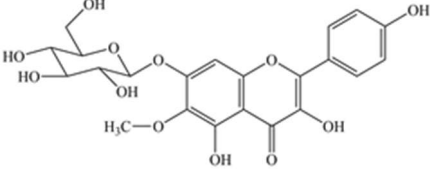
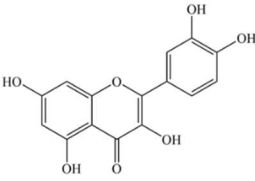
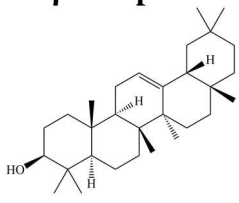
Для дальнейших исследований нами были изучены водно-спиртовые извлечения соцветий бархатцев отклоненных различных сортов методом прямой и дифференциальной спектрофотометрии. Сравнительное исследование УФ-спектров растворов водно-спиртовых извлечений показало, что их спектры имеют близкие характеристики, как в случае исходных растворов, так и в присутствии алюминия хлорида. Установлено, что в дифференциальном варианте батохромный сдвиг длинноволновой полосы для всех исследуемых образцов обнаруживается в области 426-430 нм.

Полученные по результатам хроматографических и спектрофотометрических исследований данные позволили предположить перспективность дальнейшего изучения химического состава соцветий бархатцев отклоненных.

Для последующего анализа химического состава соцветий бархатцев отклоненных проводилось выделение индивидуальных биологически активных соединений из указанных данного вида растительного сырья методом адсорбционной колоночной хроматографии. Для определения химической структуры выделенных веществ использовали методы  $^1\text{H}$ -,  $^{13}\text{C}$ -ЯМРСпектроскопии, масс-спектрометрии, ТСХ, а также спектрофотометрии. Выделенные и идентифицированные вещества представлены в таблице 1.

**Таблица 1 - Характеристики веществ, выделенных из соцветий бархатцев отклоненных**

№ п/п	Название и химическая формула вещества	Характеристика вещества
1.	<p><b>Патулитрин</b> (7-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидрокси-6-метоксифлавона)</p> 	Кристаллическое вещество ярко-желтого цвета состава $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{13}$ с т. пл. 250-252 °С (спирт этиловый).
2.	<p><b>Патулетин</b> (3,5,7,3',4'-пентагидрокси-6-метоксифлавонон)</p> 	Кристаллическое вещество ярко-желтого цвета состава $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_8$ ; т.пл. 265-267 °С (водный спирт).

3.	<p align="center"><b>6-метоксикемпферол</b> (3,5,7,4'-тетрагидрокси-6-метоксифлавонон)</p> 	Аморфное вещество желто-оранжевого цвета состава $C_{16}H_{12}O_7$ ; т.пл. 269-271 °С.
4.	<p align="center"><b>7-О-β-D-глюкопиранозид 6-метоксикемпферола</b> (7-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-6-метоксифлавонона)</p> 	Аморфное вещество желтого цвета состава $C_{22}H_{22}O_{12}$ .
5.	<p align="center"><b>Кверцетин</b> (3,5,7,3',4'-пентагидрокси-флавонон)</p> 	Ярко-желтое кристаллическое вещество состава $C_{15}H_{10}O_7$ с т.пл. 310-312 °С.
6.	<p align="center"><b>β-амирин</b></p> 	Кристаллическое вещество белого цвета состава $C_{30}H_{50}O$ ; т.пл. 196-198 °С.

Определено, что патулитрин и патулетин являются диагностически значимыми веществами соцветий бархатцев отклоненных. Проведенное сравнительное спектрофотометрическое исследование показало, что характер спектра поглощения водно-спиртовых извлечений соцветий во многом определяют вышеперечисленные соединения (рис. 5-8).

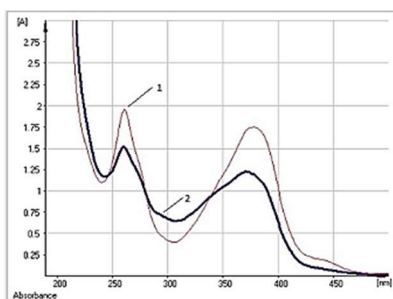


Рисунок 5 – Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения соцветий бархатцев отклоненных (1) и патулитрина (2).

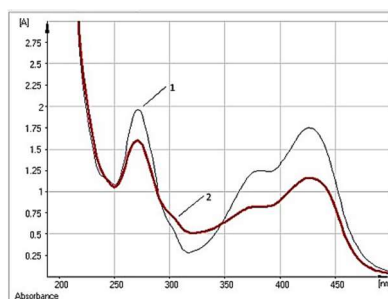


Рисунок 6 – Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения соцветий бархатцев отклоненных в присутствии алюминия хлорида (1) и патулитрина в присутствии алюминия хлорида (2).

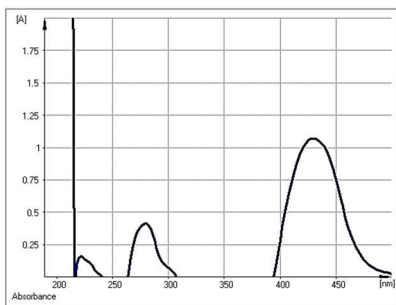


Рисунок 7 – Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения из соцветий бархатцев отклоненных в условиях дифференциальной спектрофотометрии

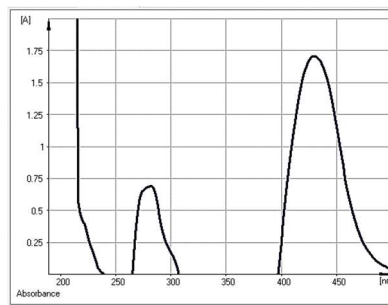


Рисунок 8 – Электронный спектр раствора патулитрина в условиях дифференциальной спектрофотометрии

С использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии был проведен предварительный анализ компонентного состава извлечения соцветий бархатцев отклоненных в целях идентификации выделенных химических соединений. Установлено, что доминирующим и диагностически значимым соединением данного вида сырья является патулитрин (рис. 9 и 10).

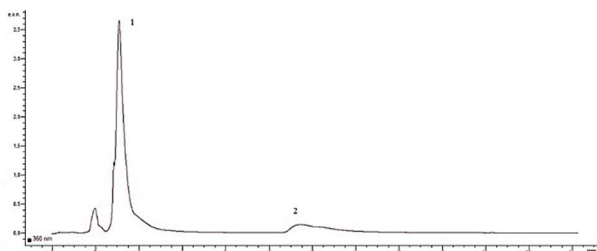


Рисунок 9 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из соцветий бархатцев отклоненных.

Обозначения: 1 – патулитрин; 2 – патулетин.

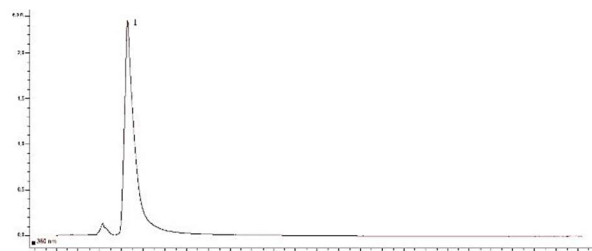


Рисунок 10 – ВЭЖХ-хроматограмма патулитрина.

Обозначения: 1 – патулитрин.

С целью изучения флавоноидного состава надземной части бархатцев отклоненных (стебли и листья) был проведен сравнительный ТСХ и спектральный анализ водно-спиртовых извлечений из травы и соцветий бархатцев отклоненных. Определено, что все изучаемые сорта растения имеют схожий химический состав. Нами было установлено, что флавоноидный состав водно-спиртовых извлечении из травы бархатцев отклонённых значительно отличается от соцветий бархатцев отклоненных, в которой методом ТСХ в присутствии растворов образцов сравнения подтверждено наличие патулетина и патулитрина. Характеристики спектров поглощения для всех объектов значительно отличаются между собой. В дифференциальном варианте максимум поглощения кривой электронного спектра из травы бархатцев отклоненных находится в области 412-414 нм.

Характеристики веществ, выделенных методом адсорбционной колоночной хроматографии из экстракта стеблей и листьев *Tagetes patula* L., приведены в таблице 2.

**Таблица 2 – Характеристики веществ, выделенных из травы бархатцев отклоненных**

<b>№ п/п</b>	<b>Название вещества</b>	<b>Характеристика вещества</b>
1.	<b>3-7-ди-О-<math>\alpha</math>-L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидроксифлавона</b>	Аморфное вещество светло-желтого цвета состава $C_{27}H_{30}O_{14}$ .
2.	<b>3-О-<math>\beta</math>-D-ксилопиранозид-7-О-<math>\alpha</math>-L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидроксифлавона</b>	Аморфное вещество светло-желтого цвета состава $C_{26}H_{28}O_{14}$ .
3.	<b>3-О-<math>\beta</math>-D-ксилопиранозид-7-О-<math>\alpha</math>-L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона</b>	Аморфное вещество желтого цвета состава $C_{26}H_{28}O_{15}$ .
4.	<b>Кемпферол</b> (3,5,7,4'-тетрагидроксифлавон)	Светло-желтое кристаллическое вещество состава $C_{15}H_{10}O_6$ с т.пл. 284-286 °С (водный спирт).
5.	<b>Кверцетин</b> (3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавон)	Ярко-желтое кристаллическое вещество состава $C_{15}H_{10}O_7$ с т.пл. 310-312 °С.
6.	<b>Кверцитрин</b> (3-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона)	Светло-желтое кристаллическое вещество состава $C_{21}H_{20}O_{12}$ с т.пл. 186-188 °С (водный спирт).
7.	<b>7-О-<math>\alpha</math>-L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона</b>	Светло-желтое кристаллическое вещество состава $C_{21}H_{20}O_{12}$
8.	<b>Изокверцитрин</b> (3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид 3,5,7,3 <sup>1</sup> ,4 <sup>1</sup> -пентагидроксифлавона)	Светло-желтое кристаллическое вещество состава $C_{21}H_{20}O_{12}$ с т.пл. 223-225 °С (водный спирт).
9.	<b>Патулетин</b> (3,5,7,3',4'-пентагидрокси-6-метоксифлавон)	Кристаллическое вещество ярко-желтого цвета состава $C_{16}H_{12}O_8$ ; т.пл. 265-267 °С (водный спирт).
10.	<b>3-О-<math>\beta</math>-D-глюкопиранозид лупеола</b>	Игольчатые кристаллы серовато-белого цвета состава $C_{36}H_{60}O_6$ с т.пл. 195-197 °С (хлороформ-этанол).
11.	<b>3-О-<math>\beta</math>-D-глюкопиранозид <math>\beta</math>-амирина</b>	Игольчатые кристаллы серовато-белого цвета состава $C_{36}H_{60}O_6$ с т.пл. 195-197 °С (хлороформ-этанол).

### **3. Разработка подходов к стандартизации соцветий и травы *Tagetes patula* L.**

В рамках диссертационной работы в рамках фитохимического исследования соцветий бархатцев отклоненных были выделены и идентифицированы диагностически значимые соединения группы флавоноидов – патулитрин и патулетин. Следовательно, указанные соединения целесообразно использовать в качестве стандартных образцов при разработке методик определения основных групп БАС и количественного анализа данного вида сырья.

Определение подлинности сырья методами ТСХ и спектрофотометрии.

С целью разработки подходов к стандартизации соцветий бархатцев отклоненных нами были проведены хроматографические исследования и выявлен ряд особенностей хроматографических профилей изучаемых объектов. В качестве стандартов использовались не только диагностически значимые флавоноиды сырья, но и кверцетин, поскольку предварительные исследования показали, что патулетин и кверцетин имеют практически одинаковое значение  $R_f$ , однако значительно отличаются между собой по окраске свечения при просмотре в УФ-свете длинной волны 366 нм – светло-желтая и ярко-зеленая, соответственно (после обработки спиртовым раствором  $AlCl_3$  кверцетина наблюдается усиление флуоресценции и изменение её окраски с желтой на ярко-зеленую). Поэтому, ввиду отсутствия образца сравнения патулетина, кверцетин может выступать в роли вещества «свидетеля».

Определено, что наиболее эффективного разделения удалось достичь в системе растворителей: хлороформ – этанол – вода (25:18:2), просматриваемые в УФ-свете при длине волны 366 нм до и после обработки спиртовым раствором  $AlCl_3$ . На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: зона адсорбции с желтой или коричнево-желтой флуоресценцией на уровне адсорбции СО кверцетина со значением  $R_f$  около 0,8 (патулетин), зона адсорбции с желтой или коричнево-желтой флуоресценцией со значением  $R_f$  около 0,4 (патулитрин).

Дополнительно для определения подлинности сырья рекомендовано проведение спектрофотометрического анализа. Испытуемые растворы извлечений соцветий бархатцев отклоненных фотометрировали и устанавливали максимумы поглощения (табл. 3)

**Таблица 3 – Установленные значения максимумов поглощения испытуемых растворов соцветий бархатцев отклоненных**

Условия фотометрирования	Прямой метод	Дифференциальный метод
$\lambda_{max}$ , нм	260±2, 375±2	428±2

**Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных.**

С целью разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных были определены основные параметры пробоподготовки. Результаты исследования зависимости различных параметров экстракции на выход действующих веществ из сырья показали, что оптимальными условиями экстракции являются: степень измельчения сырья до размера частиц 3 мм, однократное извлечение 70 % этиловым спиртом на кипящей водяной бане в течение 45 минут в соотношении «сырье-экстрагент» - 1:50. Пересчет суммы флавоноидов проводили на патулитрин, доминирующий флавоноид данного растительного сырья.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных.

Аналитическую пробу сырья бархатцев отклоненных измельчают до размера частиц 3 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на весах с точностью до  $\pm 0,01$ . Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 45 минут. Затем колбу закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до

первоначальной массы. Извлечение остужают в течение 30 минут и фильтруют через фильтр с красной полосой (извлечения из соцветий).

Испытуемый раствор для анализа суммы флавоноидов готовят следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки 96% этиловым спиртом (испытуемый раствор).

Раствор сравнения готовят следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 50 мл, доводят объем раствора до метки 96% этиловым спиртом (раствор сравнения).

Приготовление раствора стандартного образца патулитрина:

Около 0,02 г (точная навеска) патулитрина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 96% этиловом спирте. Затем содержимое колбы доводят 96% этиловым спиртом до метки (раствор СО патулитрина). После чего 1 мл раствора СО патулитрина помещают в мерную колбу на 25 мл, добавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида, затем доводят объем раствора до метки 96% этиловым спиртом. Раствор сравнения СО патулитрина готовят следующим образом: 1 мл полученного раствора помещают в мерную колбу на 25 мл, доводят объем раствора до метки 96% этиловым спиртом.

Измерение оптической плотности проводят при длине волны 428 нм через 30 минут после приготовления всех растворов.

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

$$X = \frac{D * m_o * 50 * 1 * 50 * 100 * 100}{D_o * m * 50 * 1 * 25 * (100 - W)},$$

где:

$D$  – оптическая плотность испытуемого раствора;

$D_o$  – оптическая плотность раствора стандартного образца патулитрина;

$m$  – масса сырья, г;

$m_o$  – масса стандартного образца патулитрина, г;

$W$  – потеря в массе при высушивании в процентах.

В случае отсутствия стандартного образца патулитрина для расчета целесообразно использовать теоретическое значение его удельного показателя поглощения, равное 320:

$$X = \frac{D * 50 * 1 * 50 * 100}{m * 320 * 1 * (100 - W)},$$

где:

$D$  – оптическая плотность испытуемого раствора;

$m$  – масса сырья, г;

320 – удельный показатель поглощения ( $E_{1\text{см}}^{1\%}$ ) стандартного образца патулитрина при 428 нм;

$W$  – потеря в массе при высушивании в процентах.

Метрологические характеристики разработанной методики свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения содержания суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных с доверительной вероятностью 95 % составляет  $\pm 3,86$  % (табл.4).



**Таблица 4 – Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных**

<i>f</i>	<i>Xcp</i>	<i>S</i>	<i>P, %</i>	<i>t (P,f)</i>	$\Delta X$	<i>E, %</i>
10	8,30	0,1435	95	2,23	$\pm 0,32$	$\pm 3,86$

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по показателям: специфичность, линейность и правильность. Специфичность методики определялась по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов соцветий бархатцев отклоненных и патулитрина с алюминием хлоридом. Линейность методики определяли для серии растворов патулитрина (с концентрациями в диапазоне от 0,0038 до 0,0625 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,99996. Правильность методики определяли методом добавок. Опыты с добавками стандартного образца патулитрина к навеске сырья показали, что ошибка анализа находится в пределах ошибки единичного определения, что свидетельствует об отсутствии систематической ошибки разработанной методики.

Определено, что содержание суммы флавоноидов в исследуемых образцах соцветий бархатцев отклоненных различных сортов варьирует от  $4,36 \pm 0,02\%$  до  $11,71 \pm 0,05\%$ . В связи с этим, следует рекомендовать в качестве нижнего предела содержания суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных значение не менее 4,0%.

#### **Разработка методики количественного определения патулитрина в соцветиях бархатцев отклоненных.**

Полученный ранее раствор сравнения для методики количественного определения суммы флавоноидов использовали для методики количественного определения патулитрина методом ВЭЖХ.

В жидкостной хроматограф «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») с УФ-детектором вводят 4 мкл полученного раствора. Хроматографируют в условиях обращенно-фазовой хроматографии в изократическом режиме на стальной колонке «КАХ-6-80-4» (№2; 2 мм x 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), элюентная система – ацетонитрил:вода в соотношении 3:7 с добавлением 1% уксусной кислоты, скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем элюента – 2500 мкл, объем пробы испытуемого раствора – 4 мкл.

Проводят УФ-детектирование при длине волны 360 нм, диапазон чувствительности 0,5. Проводят не менее 3 параллельных определений.

Параллельно 4 мкл раствора патулитрина (см. методику количественного определения суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных) вводят в хроматограф и хроматографируют, как описано выше. Проводят определение площади пика патулитрина и рассчитывают среднюю площадь пика по результатам 3 определений.

Определяют время удерживания и идентифицируют пик патулитрина на хроматограмме испытуемого раствора. Вычисляют площадь пика патулитрина на хроматограмме и рассчитывают среднюю площадь пика по 3 параллельным определениям.

Содержание патулитрина в соцветиях бархатцев отклоненных в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (*X*) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{S * m_0 * V * V_2 * 100 * 100}{S_0 * m * V_0 * V_1 * (100 - W)}$$

где *S* – среднее значение площади пика патулитрина испытуемого раствора, вычисленное из хроматограмм раствора испытуемого образца; *S*<sub>0</sub> – среднее значение площади пика раствора патулитрина, вычисленное из хроматограмм раствора патулитрина; *V* – объем извлечения, мл; *V*<sub>1</sub> – объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл; *V*<sub>0</sub> – объем раствора патулитрина, мл; *V*<sub>2</sub> – объем вводимой пробы раствора патулитрина, мкл; *m* – масса сырья, г; *m*<sub>0</sub> – масса патулитрина, г; *W* – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Метрологические характеристики разработанной методики ВЭЖХ-анализа свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения содержания патулитрина в соцветиях бархатцев отклоненных с доверительной вероятностью 95 % составляет  $\pm 3,32$  % (табл. 5).

**Таблица 5 – Метрологические характеристики методики количественного определения патулитрина в соцветиях бархатцев отклоненных.**

<i>Образец</i>	<i>f</i>	<i>X<sub>ср</sub></i>	<i>S</i>	<i>P, %</i>	<i>t (P,f)</i>	$\Delta X$	<i>E, %</i>
Извлечение из соцветий <i>T. patula</i> L.	10	5,12	0,3808	95	2,23	$\pm 0,17$	$\pm 3,32$

Установлено, что содержание патулитрина в исследуемых образцах соцветий бархатцев отклоненных сорта «Мандарин» варьирует от  $5,11 \pm 0,18\%$  до  $5,64 \pm 0,17\%$ .

### **Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве бархатцев отклоненных.**

С целью разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в траве бархатцев отклоненных были изучены УФ-спектры раствора водно-спиртового извлечения из данного сырья. Установлено, что вещества, близкие по спектральным характеристикам к рутину, во многом определяют характер кривой поглощения водно-спиртового извлечения из травы бархатцев отклоненных. В УФ-спектре водно-спиртового извлечения из травы бархатцев отклоненных в дифференциальном варианте обнаруживается максимум поглощения при длине волны  $412 \pm 2$  нм, который практически соответствует максимуму спиртового раствора рутина (дифференциальный вариант).

Следовательно, совокупность данных УФ-спектров раствора стандартного образца рутина, а также раствора водно-спиртового извлечения из травы бархатцев отклоненных позволяет рекомендовать использование в методике количественного определения суммы флавоноидов пересчет на рутин и аналитическую длину волны 412 нм.

Результаты исследования зависимости различных параметров экстракции на выход флавоноидов из сырья показали, что оптимальными параметрами экстракции являются: степень измельчения сырья до размера частиц 2 мм, однократное извлечение 70% этиловым спиртом на кипящей водяной бане в течение 45 минут в соотношении «сырье-экстрагент» - 1:50.

#### Методика количественного определения суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных.

Аналитическую пробу сырья бархатцев отклоненных измельчают до размера частиц 2 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до  $\pm 0,01$ . Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 45 минут. Затем колбу закрывают той же пробкой, охлаждают до комнатной температуры и взвешивают, восполняя недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через фильтр с красной полосой (извлечение из травы).

Испытуемый раствор для анализа суммы флавоноидов готовят следующим образом: 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 96% этиловым спиртом (испытуемый раствор).

Раствор сравнения готовят следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 25 мл, доводят объем раствора до метки 96% этиловым спиртом (раствор сравнения).

Для расчета содержания суммы флавоноидов готовят раствор стандартного образца рутина, добавляют к нему 3% спиртовой раствор алюминия хлорида, измеряют оптическую

плотность окрашенного комплекса при аналитической длине волны 412 нм и определенное значение оптической плотности используют в формуле расчета.

Приготовление раствора стандартного образца рутина.

Около 0,02 г (точная навеска) рутина помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 70% этиловом спирте. Затем содержимое колбы доводят 96% этиловым спиртом до метки. После чего 2 мл раствора рутина помещают в мерную колбу на 25 мл, добавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида, затем доводят объем раствора до метки 96% этиловым спиртом (раствор А рутина). Раствор сравнения (раствор Б рутина) готовят следующим образом: 2 мл полученного раствора помещают в мерную колбу на 25 мл, доводят объем раствора до метки 96% этиловым спиртом.

Измерение оптической плотности проводят при длине волны 412 нм через 30 минут после приготовления всех растворов.

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

$$X = \frac{D * m_o * 50 * 2 * 25 * 100 * 100}{D_o * m * 50 * 1 * 25 * (100 - W)},$$

где:

$D$  – оптическая плотность испытуемого раствора;

$D_o$  – оптическая плотность раствора стандартного образца рутина;

$m$  – масса сырья, г;

$m_o$  – масса стандартного образца рутина, г;

$W$  – потеря в массе при высушивании в процентах.

В случае отсутствия СО рутина для расчета целесообразно использовать теоретическое значение его удельного показателя поглощения, равного 237:

$$X = \frac{D * 50 * 1 * 25 * 100}{m * 237 * 1 * (100 - W)},$$

где:

$D$  – оптическая плотность испытуемого раствора;

$m$  – масса сырья, г;

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

$W$  – потеря в массе при высушивании в процентах.

Метрологические характеристики разработанной методики свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения содержания суммы флавоноидов в траве бархатцев отклоненных с доверительной вероятностью 95 % составляет  $\pm 3,13$  % (табл. 6).

**Таблица 6 – Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в траве бархатцев отклоненных**

$f$	$X_{cp}$	$S$	$P, \%$	$t(P, f)$	$\Delta X$	$E, \%$
10	2,98	0,1869	95	2,23	$\pm 0,09$	$\pm 3,13$

Специфичность методики определялась по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов травы бархатцев отклоненных и рутина с алюминием хлоридом. Линейность методики определяли для серии растворов рутина (с концентрациями в диапазоне от 0,0166 до 0,0832 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,99631.

#### 4. Определение фармакологической активности препарат и индивидуальных соединений соцветий бархатцев отклоненных.

Проведено исследование фармакологической активности экстракта густого соцветий бархатцев отклоненных, а также БАС патулитрина и патулетина.

Установлено, что при однократном внутрижелудочном введении густого экстракта соцветий бархатцев в дозе 10 мг/кг, патулетина и патулитрина в дозе 1 мг/кг на фоне 3% водной нагрузки в 4-х ч эксперименте у животных опытной группы относительно показателей водного контроля достоверно возрастал диурез (аналогично действию препарата сравнения фуросемида в пороговой дозе 1 мг/кг); к концу 24-х ч эксперимента с густым экстрактом отмечалось достоверное увеличение диуреза (аналогичное действию гипотиозида в эффективной средней терапевтической дозе 20 мг/кг), а также креатининуриза (свидетельствующее о возрастании клубочковой фильтрации).

Изучено дозозависимое действие экстракта густого соцветий бархатцев отклоненных и патулитрина на ЦНС. Определено, что при однократном внутрижелудочном введении густой экстракт в дозе 10 мг/кг и патулитрин в дозе 2 мг/кг способствовали достоверному увеличению двигательной активности опытных животных относительно водного контроля, что свидетельствует об антидепрессантом действии исследуемых образцов.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное фармакогностическое исследование бархатцев отклоненных позволило сформулировать следующие общие выводы:

1. Методами световой и люминесцентной микроскопии установлены наиболее значимые диагностические признаки соцветий бархатцев отклоненных, среди которых: конусовидные одноклеточные волоски – папиллы на отгибе венчика язычкового цветка; гусенице-видные волоски с характерным пигментированным протопластом; млечные каналы с пигментированным млечным соком в структуре жилок трубки венчика язычковых цветков; простые вытянутые волоски с волнистыми стенками на отгибе венчика трубчатого цветка; вееровидная форма рыльца пестика у язычковых цветков, загибающаяся к основанию; лизигенные вместилища в обертках соцветий; гиподермальный слой склеренхимных волокон оберток соцветий; армированные коллатеральные пучки с тремя рядами ксилемных сосудов на поперечном сечении оберток соцветий.

2. Из соцветий бархатцев отклоненных (сорт «Мандарин») выделены 5 флавоноидов (патулитрин, патулетин, 6-метоксикемпферол, 7-О-β-D-глюкопиранозид 6-метоксикемпферола и кверцетин) и вещество сапониновой природы (β-амирин). Структура веществ подтверждена данными УФ-, <sup>1</sup>H-ЯМР-, <sup>13</sup>C-ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, а также результатами кислотного и ферментативного гидролиза. Определено, что патулитрин и патулетин являются диагностически значимыми флавоноидами соцветий, а 6-метоксикемпферол и его гликозид впервые выделены из сырья данного растения.

3. Из надземной части (листья и стебли) бархатцев отклоненных впервые выделены 6 флавоноидных соединений: 3-О-α-L-рамнопиранозид-7-О-α-L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидроксифлавона, 3-О-β-D-ксилопиранозид-7-О-α-L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидроксифлавона, 3-О-β-D-ксилопиранозид-7-О-α-L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона, кемпферол (3,5,7,4'-тетрагидроксифлавон), кверцитрин (3-О-α-L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона), изокверцитрин (3-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона). 3-О-β-D-ксилопиранозид-7-О-α-L-рамнопиранозид кемпферола и 3-О-β-D-ксилопиранозид-7-О-α-L-рамнопиранозид кверцетина являются новыми природными соединениями. Определено, что доминирующим и диагностически значимым флавоноидом надземной части бархатцев отклоненных является 3-7-ди-О-α-L-рамнопиранозид кемпферола. Впервые из травы изучаемого вида растения выделены сапонины, представляющие собой смесь 3-О-β-D-глюкопиранозида лупеола и 3-О-

$\beta$ -D-глюкопиранозида  $\beta$ -амирина, в отличие от соцветий, в которой данные вещества содержатся в форме агликона.

4. При разработке подходов к стандартизации соцветий бархатцев отклоненных установлено, что одним из способов определения подлинности сырья является тонкослойная хроматография в системе растворителей хлороформ – этиловый спирт 96% – вода (в соотношении 25:18:2) и детектирование пластинки в УФ-свете при длине волны 366 нм до и после обработки спиртовым раствором  $AlCl_3$ . В качестве стандартного образца для детектирования доминирующих флавоноидов сырья нами рекомендовано использовать патулетин и патулитрин, или в отсутствие этих образцов сравнения – кверцетин в связи с тем, что патулетин и кверцетин имеют практически одинаковое значение  $R_f$ .

5. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на патулитрин для соцветий бархатцев отклоненных в условиях дифференциальной спектрофотометрии при  $\lambda_{max} = 428 \pm 2$  нм. Была проведена валидационная оценка разработанной методики. Определено, что содержание суммы флавоноидов в исследуемых образцах соцветий бархатцев отклоненных различных сортов варьирует от  $4,36 \pm 0,02\%$  до  $11,71 \pm 0,05\%$ , при этом ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет  $\pm 3,86\%$ .

6. Для количественного определения содержания доминирующего флавоноида в сырье – патулитрина, разработана методика с использованием ВЭЖХ. Была проведена валидационная оценка разработанной методики. Установлено, что содержание патулитрина в исследуемых образцах соцветий бархатцев отклоненных сорта «Мандарин» варьирует от  $5,11 \pm 0,18\%$  до  $5,64 \pm 0,17\%$ . Метрологические характеристики разработанной методики ВЭЖХ-анализа свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения содержания патулитрина в соцветиях бархатцев отклоненных с доверительной вероятностью 95% составляет  $\pm 3,32\%$ .

7. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в траве бархатцев отклоненных методом дифференциальной спектрофотометрии при  $\lambda_{max} = 412 \pm 2$  нм в пересчете на рутин. Установлено, что содержание суммы флавоноидов в исследуемых образцах травы бархатцев отклоненных различных сортов варьирует от  $1,64 \pm 0,03\%$  до  $4,22 \pm 0,05\%$ .

8. В ходе исследования фармакологической активности экстракта густого соцветий бархатцев отклоненных, патулитрина и патулетина, установлено диуретическое и нейротропное действие как исследуемого препарата, так и вышеперечисленных флавоноидов.

9. Разработан проект фармакопейной статьи «Бархатцев отклоненных цветки».

**Практические рекомендации.** Результаты диссертационной работы будут способствовать совершенствованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды, и могут быть использованы в учебном процессе по дисциплинам «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия», а также в организациях и предприятиях, специализирующихся в области создания, стандартизации, сертификации и контроля качества лекарственных препаратов и лекарственных средств.

**Перспективы дальнейшей разработки.** Проведение дальнейших исследований объектов диссертационной работы имеет научно-практическое значение для решения актуальных задач фармации в области фармакогнозии и фармацевтической химии. Планируется осуществление экспериментально-аналитической работы по углубленному изучению химического состава сортовых форм бархатцев отклоненных и их различных органов, а также других видов растений рода *Tagetes* L., и последующая разработка современных, объективных и унифицированных подходов к стандартизации новых видов лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Куркина, А.В. Количественное определение суммы флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных / А.В. Куркина, А.Е. Савельева, В.А. Куркин // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2021. – Т. 55. – № 2. – С. 46-50.
2. Савельева, А.Е. Определение содержания патулитрина в цветках бархатцев отклоненных методом ВЭЖХ / А.Е. Савельева, В.А. Куркин, А.В. Куркина // **Фармация**. – 2021. – Т. 70. – № 6. – С. 24-30.
3. Савельева, А.Е. Актуальные проблемы стандартизации цветков бархатцев отклоненных / А.Е. Савельева, А.В. Куркина // **Аспирантский вестник Поволжья**. – 2021. – № 5-6. – С. 105-111.
4. Куркина, А.В. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве бархатцев отклоненных / А.В. Куркина, Савельева А.Е., Куркин В.А. // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2022. – Т. 56. – № 5. – С. 43-46.
5. Куркин, В.А. Диуретическая активность флавоноидов и густого экстракта цветков бархатцев отклоненных / В.А. Куркин, Е.Н. Зайцева, А.В. Куркина, А.Е. Савельева, А.И. Климова, А.С. Цибина // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2022. – Т. 56. – № 11. – С. 33-36.
6. Куркин, В.А. Разработка подходов к стандартизации цветков бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.) / В.А. Куркин, А.Е. Савельева, А.В. Куркина // **Химия растительного сырья**. – 2022. – № 4. – С. 221-231.
7. Kurkina, A.V. Quantitative determination of total flavonoids in *Tagetes patula* Marigold flowers / A.V. Kurkina, A.E. Savel'eva, V.A. Kurkin // **Pharmaceutical Chemistry Journal**. – 2021. – Vol. 55. – No. 2. – С. 165-169.
8. Kurkin, V.A. HPLC analysis of patulitrin and patuletin in flowers of *Tagetes patula* L./ V.A. Kurkin, A.E. Saveleva, A.V. Kurkina // **Research Journal of Pharmacy and Technology**. – 2022. – Vol. 15. – No. 5. – С. 2216-2220.
9. Kurkina, A.V. Development of quantitative determination methods for total flavonoids in *Tagetes patula* L. herbs / A.V. Kurkina, A.E. Savel'eva, V.A. Kurkin // **Pharmaceutical Chemistry Journal**. – 2022. – Vol. 56. – No. 5. – С. 657-660.
10. Савельева, А.Е. Фенольные соединения бархатцев отклоненных / А.Е. Савельева, Д.А. Белоусова, Д.И. Стреликова, Ю.А. Андреева, В.М. Рыжов, В.А. Куркин, И.В. Рузаева // Фенольные соединения: свойства, активность, инновации: сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума, Москва, 14-19 мая 2018 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, 2018. – С. 372-376.
11. Савельева, А.Е. Результаты фармакогностического исследования бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.) / А.Е. Савельева, А.В. Куркина // Аспирантские чтения - 2020. Молодые ученые: научные исследования и инновации: Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 90-летию з.д.н. РФ профессора А.А. Лебедева, Самара, 15 октября 2020 года. – Самара: ООО «СамЛюксПринт», Самарский государственный медицинский университет, 2020. – С. 270-272.
12. Савельева, А.Е. Изучение флавоноидов цветков бархатцев отклоненных / А.Е. Савельева, А.В. Куркина, В.А. Куркин // Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения: Сборник трудов международной научной конференции молодых ученых, Москва, 17–18 декабря 2020 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений", 2020. – С. 268-273.

13. Савельева, А.Е. Стандартизация цветков бархатцев отклоненных / А.Е. Савельева, А.В. Куркина, В.А. Куркин // 90 лет - от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы: сборник материалов юбилейной международной научной конференции, Москва, 10–11 июня 2021 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений", 2021. – С. 454-464.

14. Савельева, А.Е. Определение содержания биологически активных веществ в цветках различных сортов бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.) / А.Е. Савельева, А.В. Куркина, В.А. Куркин // Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы: сборник материалов международной научно-практической конференции, Томск, 13-16 сентября 2021 года. – Томск: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2021. – С. 149-151.

15. Савельева, А.Е. Вопросы стандартизации цветков бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.) / А.Е. Савельева, А.В. Куркина // Аспирантские чтения - 2021. Молодые ученые: научные исследования и инновации: Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Самара, 13-14 октября 2021 года. – Самара: ООО «СамЛюксПринт», Самарский государственный медицинский университет, 2021. – С. 285-287.

16. Андреева, Ю.А. Сравнительное фитохимическое исследование надземной части бархатцев отклоненных различных сортов / Ю.А. Андреева, Д.А. Белоусова, А.Е. Савельева, А.В. Куркина // Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы: сборник трудов научно-практической онлайн-конференции с международным участием, Самара, 26-27 октября 2021 год. – Самара: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение Высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2021. – С. 445-450.

17. Савельева, А.Е. Сравнительное фитохимическое исследование надземной части бархатцев отклоненных различных сортов / Савельева А.Е., Куркина А.В. // Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты: сборник научных статей по материалам XI Международного симпозиума, Москва, 11-15 апреля 2022 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, 2022. – С. 210.

18. Савельева, А.Е. Сравнительное фитохимическое исследование цветков и травы бархатцев отклоненных / А.Е. Савельева, А.В. Куркина // Природные соединения и здоровье человека: сборник научных статей Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием, Иркутск, 27 мая 2022 года. – Иркутск: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2022. – С. 73-77.

19. Савельева, А.Е. Определение содержания суммы флавоноидов в надземной части бархатцев отклоненных различных сортов / А.Е. Савельева // От биохимии растений к биохимии человека: сборник трудов международной научной конференции, Москва, 16-17 июня 2022 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений", 2022. – С. 242-247.

**Патент**

Патент № 2772821 С1 Российская Федерация, МПК С11В 3/00, А61К 36/185. Способ количественного определения суммы флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных: № 2021111797: заявл. 23.04.2021: опубл. 26.05.2022 / В.А. Куркин, А.Е. Савельева, А.В. Куркина; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Самарский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.