

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

На правах рукописи

САВЕЛЬЕВА АННА ЕВГЕНЬЕВНА

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

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
Куркина Анна Владимировна,
доктор фармацевтических наук,
доцент

Самара – 2023

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	5
ГЛАВА 1. ОПЫТ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ БАРХАТЦЕВ ОТКЛОНЕННЫХ (<i>TAGETES PATULA</i> L.) В КАЧЕСТВЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)	15
1.1. Ареал произрастания и культивирования представителей рода <i>Tagetes</i> L...	15
1.2. Ботаническое описание растения	16
1.3. Химический состав различных морфологических органов растения	17
1.4. Область применения бархатцев отклоненных	23
1.5. Опыт применения <i>T. patula</i> L. в народной медицине.....	24
1.6. Фармакологическая активность растительного сырья и веществ, выделенных из бархатцев отклоненных	25
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	27
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И ПРИМЕНЯЕМЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ .	29
2.1. Объекты исследования	29
2.2. Оборудование, материалы и реактивы, используемые в исследовании	30
2.3. Характеристика методов исследования.....	31
2.3.1. Методы проведения морфолого-анатомического анализа	31
2.3.2. Химический метод анализа. Кислотный и ферментативный гидролиз ..	31
2.3.3. Хроматографические методы анализа	32
2.3.4. Физико-химические методы анализа	33
2.3.5. Технологические методы анализа	33
2.3.6. Фармакологические методы анализа	34
ГЛАВА 3. АНАТОМО-ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЦВЕТКОВ И ОБЁРТКИ СОЦВЕТИЙ БАРХАТЦЕВ ОТКЛОНЁННЫХ	37
3.1. Язычковые цветки	37
3.2. Трубоччатые цветки.....	40
3.3. Гинецей и андроцей обоих цветков соцветия	43
3.4. Обёртка соцветия	46
3.5. Пыльца.....	48
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	49
ГЛАВА 4. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЕЩЕСТВ ИЗ СОЦВЕТИЙ И ТРАВЫ БАРХАТЦЕВ ОТКЛОНЕННЫХ	50

4.1. Выделение индивидуальных веществ из изучаемых видов сырья.....	50
4.2. Идентификация индивидуальных соединений соцветий бархатцев отклоненных.	51
4.3. Идентификация БАС, выделенные из травы бархатцев отклоненных.....	56
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	65
ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ СЫРЬЯ БАРХАТЦЕВ ОТКЛОНЕННЫХ	66
5.1. Качественный анализ соцветий <i>Tagetes patula</i> L. методом ТСХ.....	66
5.2. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных методом дифференциальной спектрофотометрии.....	69
5.3. Определение содержания патулитрина в соцветиях бархатцев отклоненных методом ВЭЖХ.	80
5.4. Определение содержания суммы каротиноидов в соцветиях	86
5.5. Сравнительное фитохимическое исследование соцветий и травы <i>Tagetes patula</i> L.	88
5.6. Разработка методики количественного анализа содержания суммы флавоноидов в траве бархатцев отклоненных	91
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5	98
ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГУСТОГО ЭКСТРАКТА ИЗ СОЦВЕТИЙ БАРХАТЦЕВ ОТКЛОНЕННЫХ, А ТАКЖЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ НИХ.....	100
6.1. Изучение диуретической активности густого экстракта и флавоноидов соцветий бархатцев отклоненных	102
6.2. Изучение нейротропной активности густого экстракта соцветий и патулитрина	104
6.3. Изучение острой токсичности густого экстракта соцветий бархатцев отклоненных.	106
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6.	107
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	108
Список литературы	112
ПРИЛОЖЕНИЯ	127
Приложение 1. Патент на изобретение «Способ количественного определения суммы флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных».....	128
Приложение 2. Акты внедрения результатов диссертационной работы.	129

Приложение 3. Н ¹ -ЯМР, С ¹³ -ЯМР - и масс-спектры индивидуальных соединений, выделенных из цветков бархатцев отклоненных.	137
Приложение 4. Методика количественного определения суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных.....	144
Приложение 5. Методика количественного определения суммы каротиноидов в соцветиях бархатцев отклоненных.....	146
Приложение 6. Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве бархатцев отклоненных.....	147
Приложение 7. Методика количественного определения патулитрина в соцветиях бархатцев отклоненных.....	149
Приложение 8. Проект фармакопейной статьи на новый вид лекарственного растительного сырья «Бархатцев отклоненных цветки».....	151

ВВЕДЕНИЕ

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 β -амирин, 3,5,7,4'-тетрагидрокси-6-метоксифлавоны (6-метоксикемпферол) и его гликозид – 7-O- β -D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-6-метоксифлавона. Из травы бархатцев отклоненных впервые выделены 3-O- α -L-рамнопиранозид-7-O- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидроксифлавона, 3-O- β -D-ксилопиранозид-7-O- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидроксифлавона, 3-O- β -D-ксилопиранозид-7-O- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона, кемпферол (3,5,7,4'-тетрагидроксифлавоны), кверцитрин (3-O- α -L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона), изокверцитрин (3-O- β -D-глюкопиранозид 3,5,7,3¹,4¹-пентагидроксифлавона), а также 3-O- β -D-глюкопиранозид лупеола и 3-O- β -D-глюкопиранозид β -амирина. Для перечисленных веществ были описаны

спектральные характеристики ^1H -ЯМР- и ^{13}C -ЯМР-спектров, получены результаты масс-спектрометрического 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 обёрток 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 β -амирин, а также флавоноиды 6-метоксикемпферол и его 7-O- β -D-глюкопиранозид.

Впервые в РФ изучена надземная часть бархатцев отклонённых, 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-O- β -D-глюкопиранозид лупеола и 3-O- β -D-глюкопиранозид β -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 густой 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-спектрологии, 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 отклонённых (*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 статья 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.

ГЛАВА 1. ОПЫТ И ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ БАРХАТЦЕВ ОТКЛОНЕННЫХ (*TAGETES PATULA* L.) В КАЧЕСТВЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТЕНИЯ (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

Лекарственное растительное сырье широко используется в современной фармацевтической промышленности для получения целого ряда лекарственных растительных препаратов (ЛРП), сочетающих в себе широкий спектр фармакологической активности [17, 19, 20, 23, 24, 41]. Такие лекарственные препараты нашли применение в лечении хронических нозологий благодаря отсутствию значительного количества побочных эффектов и противопоказаний, а также доступности и дешевизне производства. Эффективность некоторых ЛРП обоснована в том числе и с позиции доказательной медицины [5, 10].

В этой связи актуальным является поиск новых лекарственных растений, которые в дальнейшем послужат сырьевыми источниками для создания безопасных и эффективных лекарственных препаратов. Одним из таких растений являются бархатцы отклоненные (*Tagetes patula* L.).

1.1. Ареал произрастания и культивирования представителей рода *Tagetes* L.

Род *Tagetes* принадлежит к семейства Астровые (*Asteraceae*), или Сложноцветные (*Compositae*) и содержит более 50 культивируемых и дикорастущих видов. Бархатцы родом из Америки, но некоторые виды встречаются в Африке, Азии и Европе [13, 28, 42, 56, 67, 69, 107]. Представители рода *Tagetes* являются одними из самых распространенных садовых растений во всем мире. Бархатцы популярны среди садоводов благодаря простоте выращивания, широкой адаптивности, низкой требовательности к экологическим и технологическим факторам, а также длительному цветению [7, 42, 56, 70].

Наибольший интерес вызывают такие виды, как *Tagetes patula* L., *T. erecta* L. и *T. signata* L., относящиеся к числу наиболее известных и распространенных представителей рода Бархатцы (рис. 1).



Рисунок 1 – Представители рода *Tagetes* L. [110].

Обозначения: 1 – *T. patula* L.; 2 – *T. signata* L.; 3 – *T. erecta* L.

Вид *T. patula* (бархатцы отклоненные) произрастает в горных районах Мексики и Аргентины, но в настоящее время широко культивируется во всем мире. Дата его интродукции в Европу неизвестна, но впервые о данном виде сообщили во Франции около 1880 г., поэтому в литературных источниках можно встретить его синонимичное название «бархатцы французские» (French marigold) [70]. Этот вид также хорошо акклиматизировался и на территории Российской Федерации (за исключением Крайнего Севера), где его разводят в садах и на клумбах в качестве обильноцветущего декоративного растения [13, 40, 42, 53]. Это свидетельствует о возможности промышленного культивирования данного вида растения с целью получения сырья для создания лекарственных растительных препаратов или выделения биологически активных соединений.

1.2. Ботаническое описание растения

Бархатцы отклоненные (*Tagetes patula* L.) – однолетнее пахучее травянистое растение, высотой от 15 до 100 см в зависимости от условий произрастания и сорта [11, 15, 28, 34, 42, 70].

Корневая система данного растения сильно разветвленная, мощная, без явно выраженного стержневого корня [15, 34]. Одним из характерных морфологических признаков данного растения является прямой стебель с множеством отклоненных ветвей. Листья перисто-рассечённые, по краю пильчатые, остроконечные [11, 13, 15, 34, 46, 70]. Окраска листа бархатцев отклоненных темно-зеленая. Цветки мелкие, собраны в соцветия. Соцветие – одиночная чашеобразная корзинка. Обертка состоит из пяти сросшихся листочков с острыми свободными верхушкам. Цветоложе голое, наружные цветки язычковые, внутренние – трубчатые, оба типа цветков дают плоды [13, 26, 34, 44, 45, 70]. Окраска цветков, а также количество корзинок на одном растении зависит от сортовых форм бархатцев отклоненных, а также от условий произрастания. Плоды – семянки, по форме продолговатые, коричневого или черного цвета [2, 34, 42].

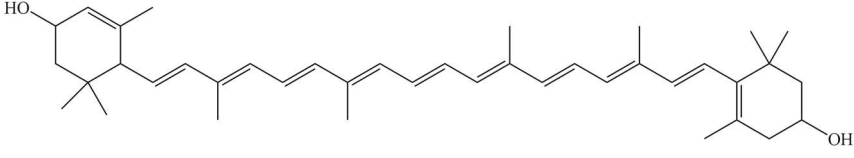
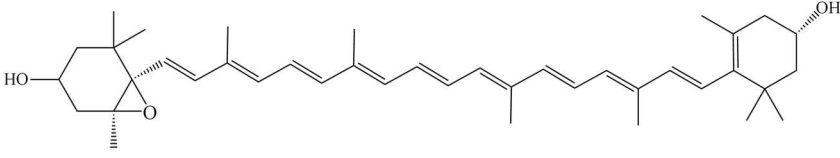
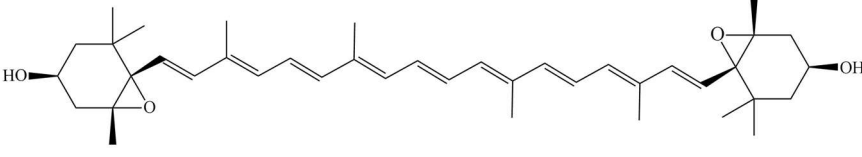
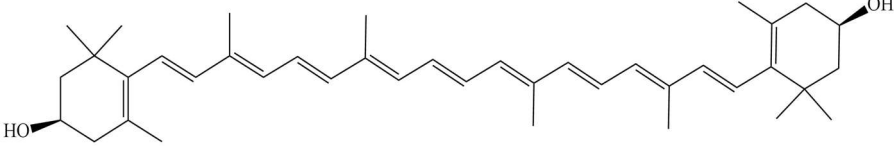
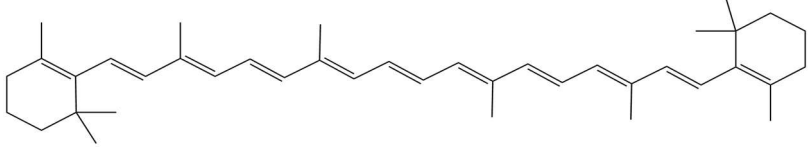
1.3. Химический состав различных морфологических органов растения

Соцветия бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.) характеризуются широким набором биологически активных веществ. Доминирующими группами БАС для данного вида сырья являются каротиноиды, эфирное масло и флавоноиды [4, 11, 13, 25, 28, 39, 40, 43]. В литературе для соцветий описано также наличие дубильных и пектиновых веществ, простых фенолов, церамидов, антоцианов, кумаринов, ферментов и жирных кислот [16, 28, 39, 49, 50, 53, 55, 63].

Содержание каротиноидов варьируется в зависимости от сорта бархатцев отклоненных, морфологического органа растения, климата, места произрастания. Цветки бархатцев отклоненных отличаются высоким содержанием каротиноидов, среди которых доминирующим является лютеин [28, 40, 50, 68, 69, 79, 98, 101].

Лютеин встречается в данном виде сырья не только в свободной форме, но и в виде сложных эфиров, таких как мономирилат, димирилат, монопальмитат, дипальмитат, моностеарат и пальмитат-стеарат [68, 96, 98, 103, 108, 111]. Другими основными выделенными каротиноидами в цветках *T. patula* являются антераксантин, виолаксантин и зеаксантин и β -каротин [39, 40, 50, 64, 103]. Каротиноиды бархатцев отклоненных представлены в таблице 1.

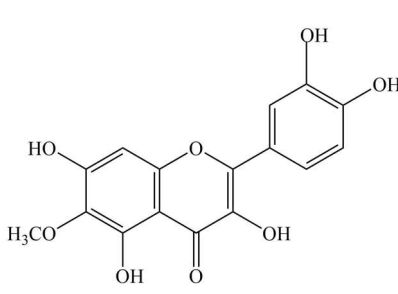
Таблица 1 – Формулы каротиноидов цветков *Tagetes patula* L.

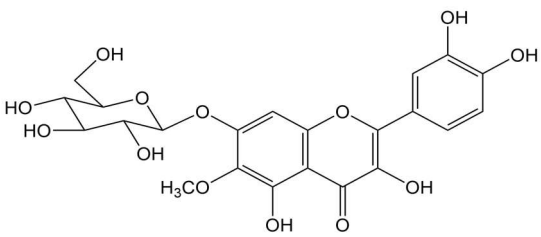
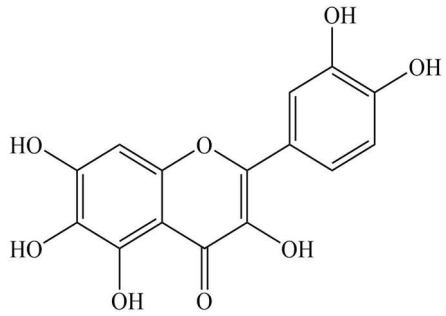
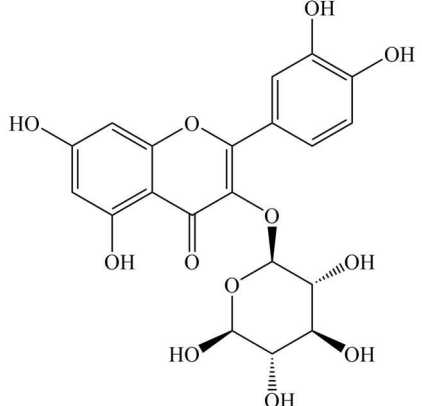
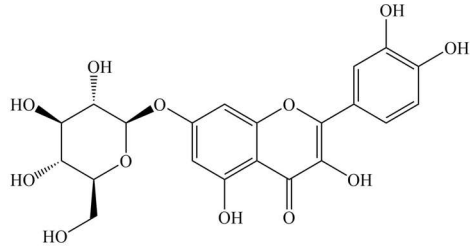
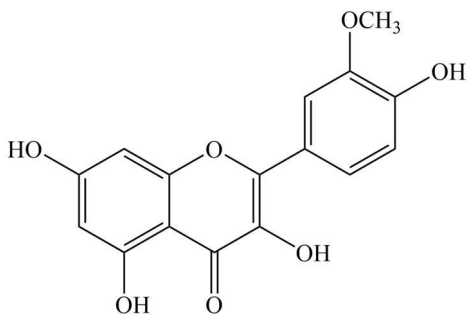
№ п/п	Химическая формула	Литературный источник
1.	 <p style="text-align: center;">Лютеин</p>	28, 40, 50, 68, 69, 79, 98, 101
2.	 <p style="text-align: center;">Антераксантин</p>	39, 40, 50, 64, 103
3.	 <p style="text-align: center;">Виолаксантин</p>	39, 40, 50, 64, 103
4.	 <p style="text-align: center;">Зеаксантин</p>	39, 40, 50, 64, 103
5.	 <p style="text-align: center;">β-каротин</p>	39, 40, 50, 64, 103

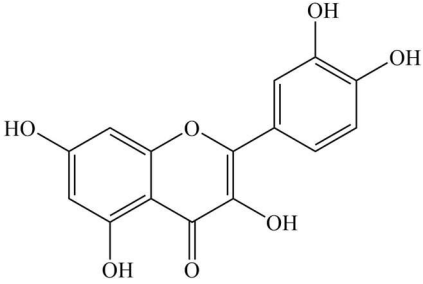
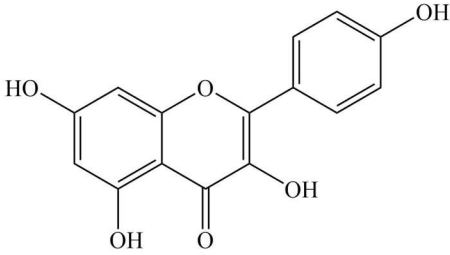
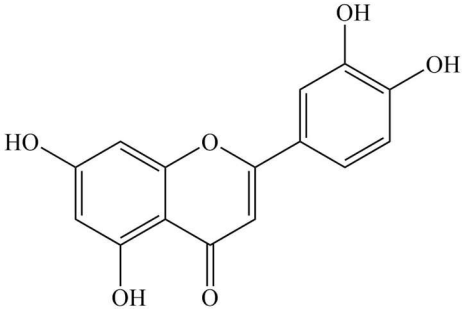
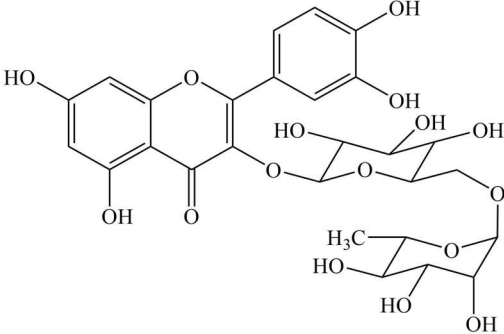
Эфирное масло у бархатцев отклоненных локализуется преимущественно в соцветиях и листьях [11, 59, 77, 103]. Согласно литературным данным химический состав эфирного масла цветков бархатцев непостоянен и зависит от селекционных особенностей растения и срока его уборки, а также географии места выращивания [4, 6, 13, 83, 93]. Обычно эфирное масло цветков содержит до 50% монотерпеновых кетонов, в том числе тагетон (15-20%), дигидротаетон (10-18%), бета-оцименон (до 15%), который иногда называют дегидротаетоном, и карвон (до 6%). Присутствуют также бета-оцимен, линалоол и линалилацетат, а также некоторые монотерпеновые и сесквитерпеновые углеводороды [7, 13, 77, 95]. По литературным данным основные компоненты масла листьев бархатцев отклоненных – оксид кариофиллена (18,4%), β-кариофиллен (18,0%) и спатуленол (9,1%) [59, 83, 100, 95, 107].

Род *Tagetes* характеризуется значительным содержанием флавоноидов [3, 25, 29, 39, 50, 107]. Для *T. patula* L. доминирующими и специфичными для данного вида являются флавоноиды патулетин и патулитрин [39, 40, 50, 54, 58, 62, 69, 80, 85]. В литературных данных также встречаются упоминания о выделении из цветков бархатцев отклоненных таких флавоноидов, как кверцететин, изокверцитрин, кверцимеритрин, изорамнетин и его гликозид, а также кверцетин, кемпферол, лютеолин и его гликозиды, рутин (табл. 2).

Таблица 2 – Флавоноиды, выделенные из цветков бархатцев отклоненных

№ п/п	Соединение	Химическая формула	Литературный источник
1.	Патулетин		25, 28, 39, 40, 49, 50, 52, 54, 58, 60, 76

2.	Патулитрин		25, 39, 40, 50, 52, 54, 76
3.	Кверцетагетин		39, 50, 58, 65, 69, 101, 104
4.	Изокверцитрин		30, 81, 103, 104
5.	Кверцимерицитрин		81, 103, 104
6.	Изорамнетин		62, 81, 85, 103, 104

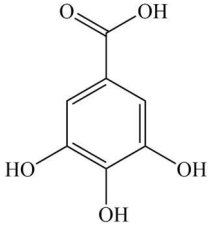
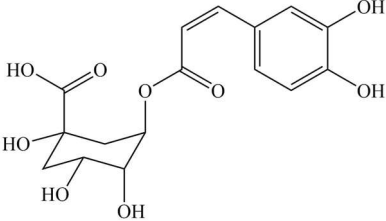
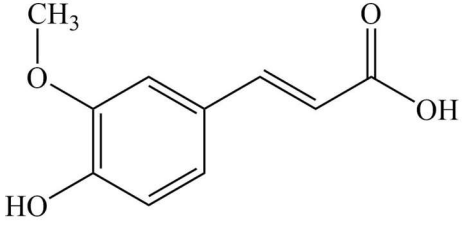
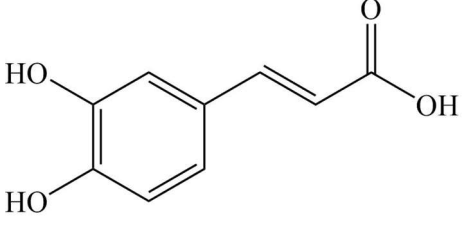
7.	Кверцетин		4, 25, 30, 37, 39, 40, 50, 52, 54, 88, 101
8.	Кемпферол		81, 85, 88, 103
9.	Лютеолин		25, 39, 40, 54, 103, 104
10.	Рутин		25, 30, 37, 39, 40, 54

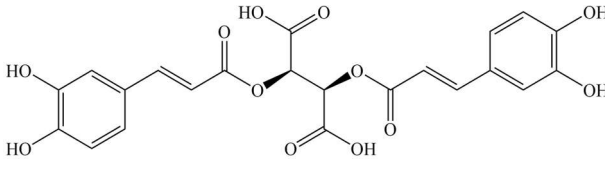
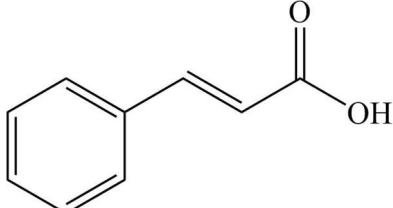
Флавоноидный состав оставшейся надземной части растения (стеблей и листьев) менее изучен. По имеющимся литературным данным в этом сырье содержатся преимущественно гликозиды флавоноидов, такие как 3-O- β -D-

глюкозид кемпферола, 3-O- α -L-арабинопиранозид кемпферола, 7-O- α -L-рамнозид кверцетина и 3-O- α -L-арабинопиранозид патулетина [30, 88, 117].

Еще одной группой фенольных соединений, представленной в соцветиях бархатцев отклоненных являются фенолкарбоновые кислоты [3, 39, 49]. Из сухого экстракта выделены и идентифицированы вещества, представленные в таблице 3.

Таблица 3 – Фенолкарбоновые и гидроксикоричные кислоты сухого экстракта соцветий *Tagetes patula* L.

№ п/п	Выделенные соединения	Формулы веществ	Литературный источник
1.	Галловая кислота		3, 39, 49
2.	Хлорогеновая кислота		3, 39, 49
3.	Феруловая кислота		3, 39, 49
4.	Кофейная кислота		3, 39, 49

5.	Цикориевая кислота		3, 39, 49
6.	Коричная кислота		3, 39, 49

В корнях некоторых видов *Tagetes*, в том числе *T. patula* L., обнаружены производные тиофена, таких как 5-(4-гидрокси-1-бутинил)-2,2'-битиенил, 5-(3-бутен-1-инил)-2,2'-битиенил, 5-метилацето-5'-(3-бутен-1-инил)-2,2'-битиенил и др. [39, 76, 99, 103, 114]. Причем данная группа веществ найдена и в соцветиях, но в меньшем количестве [1, 50, 103, 113]. В листьях же наблюдается полное отсутствие этой группы БАС [103].

Помимо вышеописанных соединений в корнях бархатцев отклоненных найдены органические кислоты (лимонная и яблочная) [106].

1.4. Область применения бархатцев отклоненных

Бархатцы отклоненные культивируют повсеместно в качестве садового декоративного растения [7, 40, 53, 70, 75, 96].

Цветки *Tagetes patula* L. широко применяются в парфюмерно-косметической промышленности. В период массового цветения их собирают для получения эфирного масла путем дистилляции, которое используется в парфюмерной продукции [7, 101, 103]. Вместе с маслом сандалового дерева используют для изготовления аромата «Genda Attar» [48, 102]. Эфирное масло бархатцев используют также в пищевой индустрии в качестве ароматизатора для табака, алкогольной и безалкогольной продукции, мороженого, леденцов, выпечки, пудингов и приправ [11, 38, 103].

Бархатцы отклоненные широко культивируются в Центральной Америке и используется в качестве пищевого красителя, одобренного Управлением по пищевым продуктам Европейского Союза [70, 96, 114].

Цветкам нашлось применение и в кулинарии. В Грузии бархатцы используются в качестве специи и называют имеретинским шафраном, в Сибири просто шафраном, хотя к настоящему шафрану, у которого используют только рыльца пестиков, они не относятся [13, 30, 38].

В культуре и духовной жизни различных стран существуют обычаи и обряды, в которых представители рода *Tagetes* являются неотъемлемыми атрибутами [58, 69, 103]. Индусы используют цветки растения во время богослужений, украшая свои храмы и святые места, во время религиозных и брачных церемоний [69, 102]. Во время фестиваля Холи люди поливают друг друга желтой водой, которую получают из бархатцев. Желтым пигментом красят деревенские дома в восточной Индии, качестве натурального красителя используют при покраске тканей.

Бархатцы – одни из символов Мексики. Соцветия бархатцев являются неотъемлемым элементом традиционного Дня Мертвых (*Día de los Muertos*). Благодаря насыщенной оранжево-красной окраске их используют в качестве подношений на алтарях в помещениях и домах, а также используют для украшения улиц и общественных мест. Мексиканцы считают, что яркие цвета и сильный аромат цветков помогает духам предков найти путь домой, в мир живых [71].

Благодаря содержанию тиофенов и флавоноидов *T. patula* L. обладают выраженной нематоцидной активностью, а также способностью очистки почвы от тяжелых металлов, что делает их перспективными в сельском хозяйстве [62, 63, 70, 87, 94, 99, 114, 118]. Надземная часть бархатцев обладает также инсектицидным действием [72, 85, 96, 101, 107, 116].

1.5. Опыт применения *T. patula* L. в народной медицине

В народной медицине водный настой цветков используют в качестве мочегонного, потогонного и противоглистного средства [4, 11, 37, 39, 48, 49]. Экстракты цветков бархатцев издавна применяются как средство для лечения заболевания желудочно-кишечного тракта [40, 66, 101].

Эфирное масло применяют для лечения неврозов, а также болезней мочевыводящей системы [13, 48, 53].

Листья употребляются в Мексике от лихорадки, запоров, как мочегонное и потогонное средства [30, 57, 97]. Данный вид растительного сырья применяется также для лечения геморроя, проблем с почками, мышечных болей, известен способ наружного применения листьев в виде аппликации на раны и отеки [57, 97, 101, 102, 112].

В литературе описано также применение бархатцев в качестве противоопухолевого растительного средства [58, 60, 84].

В народной медицине восточных стран нашли применение и плоды *T. patula*. Из них получали охлаждающие, смягчительные и успокаивающие средства [61].

1.6. Фармакологическая активность растительного сырья и веществ, выделенных из бархатцев отклоненных

Эфирное масло растения обладает антиоксидантным, антисептическим и бактерицидным действием [4, 38, 93, 105, 107].

Каротиноиды бархатцев, лютин и зексантин, применяются в качестве биологически активной добавки во время терапии офтальмологических заболеваний [27, 28, 33, 39, 78, 109]. В литературе имеются данные об антиоксидантной и противовоспалительной активности данной группы БАС в сухом экстракте цветков *T. patula* L. [64, 69, 79].

Экстракт цветков бархатцев, полученный 70% этиловым спиртом, проявляет гепатопротекторное, желчегонное и гипохолестеринемическое действие [25, 36, 43]. Причем данное действие обусловлено преимущественно флавоноидами [35, 53, 54]. Некоторые исследования указывают, что вклад в гепатопротекторную активность вносит также эфирное масло [48].

Соцветия *T. patula* обладают выраженной антиоксидантной активностью, сравнимой с активностью аскорбиновой кислоты [3, 4, 43, 50, 51, 69, 73]. Это свойство обусловлено высоким содержанием флавоноидов, в том числе патулетина, также обладающего свойствами мощного природного антиоксиданта и способного улучшать вазодилатирующую и антитромботическую функцию

эндотелия и микроциркуляцию, вследствие чего ускоряется заживление ран [8, 25, 50, 54].

Фармакологической активности отдельных флавоноидов из бархатцев отклоненных посвящено множество исследований. Помимо антиоксидантной активности, для патулетина и кверцетагетина установлена противоопухолевая активность [58, 60, 84, 120]. Проведена оценка антимеланогенного, иммуномодулирующего и противоартритного действия патулетина [82, 86]. Для флавоноидов бархатцев отклоненных установлена нейропротекторная активность [88].

Флавоноиды и полисахариды *T. patula* L. оказывают выраженное противовоспалительное действие, а также влияют на процессы метаболизма, что рекомендует использование растительного сырья бархатцев в терапии различных воспалительных заболеваний [89, 115, 119].

Благодаря флавоноидам водно-спиртовые извлечения из цветков бархатцев отклоненных отличаются высокой антибактериальной, противомаларийной, противогрибковой и противовирусной активностью [4, 58, 74, 100, 101]. Сухой экстракт также обладает противомикробным фармакологическим действием в отношении кокковой и спорообразующей микрофлоры, а также бактериостатическое действие в отношении *Escherichia coli* [37]. Флавоноиды бархатцев вносят вклад в антибактериальное действие, причем патулетин проявляет данную фармакологическую активность сильнее, чем его гликозид – патулитрин [74].

Несмотря на все вышеперечисленные фармакологические свойства *Tagetes patula* L., данное растение не является официальным на территории Российской Федерации, препаратов на его основе не разработано [9].

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. Согласно литературным данным представители рода *Tagetes* L., в том числе бархатцы отклоненные *T. patula* L. являются обильноцветущими неприхотливыми ко многим экологическим и агротехническим факторам растениями. Это свидетельствует о возможности культивирования данного вида на территории Российской Федерации, а значит и промышленного получения растительного сырья для создания лекарственного растительного препарата.

2. Химический состав цветков бархатцев отклоненных представлен преимущественно флавоноидами, ведущей группой БАС в данном виде сырья. Доминирующими флавоноидами растения являются патулетин, патулитрин, кверцетагетин, изокверцитрин, кверцетин, кемпферол и др. К другим ведущим группам БАС цветков *T. patula* L. относятся эфирное масло, состав которого зависит напрямую от ареала произрастания и сорта растения, а также каротиноиды, среди которых выделяют лютеин, зеаксантин, антераксантин, виолаксантин и β -каротин. В сырье отмечается наличие дубильных и пектиновых веществ, простых фенолов, фенолкарбоновых кислот и некоторых других биологически активных групп соединений.

3. Остальная надземная часть бархатцев отклоненных менее изучена с точки зрения химического состава. По имеющимся литературным данным в этой части растения содержатся преимущественно флавоноиды, а именно 3-O- β -D-глюкозид кемпферола, 3-O- α -L-арабинопиранозид кемпферола, 7-O- α -L-рамнозид кверцетина и 3-O- α -L-арабинопиранозид патулетина.

4. Цветки *Tagetes patula* L., а также выделенные из них БАС обладают широким спектром фармакологической активности: противовоспалительной, антиоксидантной, гепатопротекторной, желчегонной, гипохолестеринемической, противопухлевой, нейропротекторной.

5. Флавоноиды данного вида сырья обладают выраженным антибактериальным, противогрибковым и противовирусным действием. Согласно литературным данным активность суммы флавоноидов преимущественно определяет патулетин.

6. Отсутствие нормативной документации и методик стандартизации растительного сырья не позволяет ввести в фармацевтическую и медицинскую практику новые виды растительного сырья или лекарственные препараты, источником которого являются бархатцы отклоненные. В связи с этим, необходимы исследования, направленные на разработку проекта фармакопейной статьи на сырье бархатцев отклоненных.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И ПРИМЕНЯЕМЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В рамках выполнения диссертационной работы проводили исследования соцветий и оставшейся наземной части (стебли и листья) бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.), культивируемых в Самарской области. В связи с многообразием сортовых форм исследуемого вида растения нами для исследования были отобраны некоторые из них (табл. 4).

Таблица 4 – Исследуемые образцы растительного сырья

№ п/п	Сорт	Заготовленная часть растения	Год сбора
1.	<i>T. patula</i> L. «Джипси Саншайн»	Трава	2021
2.	<i>T. patula</i> L. «Кармен»	Трава	2021
3.	<i>T. patula</i> L. «Красная парча»	Соцветия, трава	2018, 2021
4.	<i>T. patula</i> L. «Красный герой»	Соцветия, трава	2018, 2021
5.	<i>T. patula</i> L. «Малыш Гармония»	Соцветия	2018
6.	<i>T. patula</i> L. «Мандарин»	Соцветия, трава	2018, 2021
7.	<i>T. patula</i> L. «Оранжевое пламя»	Соцветия, трава	2018, 2021
8.	<i>T. patula</i> L. «Оранжевый чемпион»	Соцветия, трава	2018, 2021
9.	<i>T. patula</i> L. «Скарлет София»	Соцветия	2018

Все образцы культивировались в Ботаническом саду Самарского университета. Сбор сырья проводили в период массового цветения и плодоношения растения (август-сентябрь).

Исследованы следующие экспериментальные препараты и индивидуальные соединения:

- водно-спиртовые извлечения из соцветий бархатцев отклоненных различных концентраций спирта.
- водно-спиртовые извлечения из травы бархатцев отклоненных различных концентраций спирта.

- гексановые извлечения из соцветий бархатцев отклоненных.
- густой экстракт соцветий бархатцев отклоненных.
- густой экстракт травы бархатцев отклоненных.
- индивидуальные вещества: кверцетин, патулетин (3,5,7,3',4'-пентагидрокси-6-метоксифлавоон), патулитрин (7-O- β -D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидрокси-6-метоксифлавона), рутин.

2.2. Оборудование, материалы и реактивы, используемые в исследовании

В рамках научного исследования задействованы следующие приборы и оборудование:

- весы аптечные для сыпучих материалов (ВСМ-1, ВСМ-5, ВСМ-20);
- весы аналитические «Mettler Toledo XS 204»;
- плитка электрическая Skyline DP-45B (Kromax Group Co.Ltd., Швеция);
- спектрофотометр «Specord 40» (Analytik Jena AG, Германия).
- роторный испаритель «Labtex ИР-1 ЛТ» (Лабтех, РФ);
- микроколоночный жидкостной хроматограф «Миличром-6» (НПАО «Научприбор», РФ) для проведения ВЭЖХ анализа;
- люминесцентный микроскоп марки «Альтами ЛЮМ-2». Голубой и желтый светофильтр 32 мм. Источником света служила высоковольтная ртутная лампа (НВО 100Вт); спектральный диапазон возбуждения люминесценции: голубой светофильтр - 420-550 нм; желтый светофильтр - 330-400 нм (кратность увеличения: 4x10, 10x10; 40x10, 100x10);
- Световой микроскоп марки ZEISS (модель ZEN 2). В работе использовалось лицензионное программное обеспечение – Software Licensing версии V1.0 en 04 / 2018;

Материалы и реактивы используемые при подготовке диссертации:

- хроматографические пластины марки «Sorbfil» типа ПТСХАФ-А-УФ (ООО «ИМИД», Россия);

- полиамид For Column Chromatography (CAS 63428-83-1, Sigma-Aldrich, MERK);
- силикагель L 40/100 мкм и L 100/250 мкм по ТУ 6-09-39-23-86 (ООО «ИМИД»);
- сефадекс LH-20 (Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Sweden);
- ацетонитрил для высокоэффективной жидкостной хроматографии по ТУ СОМР 3-074-06 (ООО «Компонент-Реактив», Россия);
- гексан ХЧ по СТП ТУ КОМП 2-557-13 (ООО «КомпонентРеактив», Россия);
- хлороформ ХЧ по ТУ СОМР 2-028-06 (ООО «Компонент-Реактив», Россия);
- ацетон ХЧ по ТУ 2633-018-44493179-98 (АО «Экос-1», Россия);
- спирт этиловый медицинский 96% ХЧ.

2.3. Характеристика методов исследования

2.3.1. Методы проведения морфолого-анатомического анализа

С целью изучения диагностических признаков сырья бархатцев отклоненных проводили анатоми-гистологическое исследование соцветий.

Микроскопическое исследования образцов осуществляли методами световой микроскопии в проходящем и отраженном свете и люминесцентной микроскопии. Пробоподготовка образцов, приготовление микропрепаратов, а также техника проведения микроскопического исследования были осуществлены в соответствии с требованиями ГФ РФ издания XIV, а именно ОФС.1.5.3.003.15 [9].

2.3.2. Химический метод анализа. Кислотный и ферментативный гидролиз

Кислотный гидролиз проводили по методике: Навеску 10 мг вещества с добавлением 3 мл 2% водного раствора хлористоводородной кислоты нагревают на кипящей водяной бане в течении одного часа. Полнота гидролиза определяется методом тонкослойной хроматографии. Через предварительно взвешенный стеклянный фильтр из охлажденной смеси отфильтровывали осажденные кристаллы агликона. В случае аморфного агликона из гидролизата его извлекали

хлороформом. Углеводы идентифицировали методом бумажной хроматографии [9, 23].

Ферментативный гидролиз флавоноидных гликозидов осуществляли в водном растворе β -глюкозидазы («Sigma») [23].

2.3.3. Хроматографические методы анализа

1. Тонкослойная хроматография.

Метод ТСХ использовался нами для качественного анализа водно-спиртовых извлечений из соцветий и травы бархатцев отклоненных [9, 32].

На хроматографические пластинки, предварительно помещенные в сушильный шкаф при температуре 100-105 °С для удаления влаги, на стартовую линию проводили нанесение исследуемых образцов и растворов стандартных веществ капилляром. Далее пластинку помещали в хроматографическую камеру, предварительно насыщенную парами системы растворителей не менее 24 часов. Исследование считали завершенным и извлекали пластинку из камеры, когда линия фронта растворителя оказывалась на уровне от 1 до 1,5 см от верхнего края пластинки.

Для выбора оптимальных условий качественного определения состава соцветий и травы нами были использованы в работе следующие системы растворителей:

- *n*-бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (БУВ) в соотношении 4:1:2;
- хлороформ-этиловый спирт 96%-вода в соотношении 25:18:2;
- хлороформ-этиловый спирт 96% в соотношении 4:1.

Детекцию осуществляли после полного высушивания пластинки в видимом свете, а также в УФ-свете при длине волны 254 и 365 нм. Хроматограммы проявляли 3% спиртовым раствором алюминия хлорида, раствором диазобензолсульфокислоты в щелочной среде.

2. Колоночная хроматография.

Для выделения веществ, содержащихся в сырье, использовали колоночную хроматографию на силикагеле L 40/100 (Чехия) с последующей

перекристаллизацией (чистота веществ подтверждалась физико-химическими константами и УФ-спектроскопией).

3. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ).

Хроматографический анализ осуществляли методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на микроколоночном жидкостном хроматографе «Милихром-6» в следующих условиях: изократический режим, стальная 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 [9, 21].

2.3.4. Физико-химические методы анализа

Спектрофотометрия. Регистрацию спектров проводили с помощью спектрофотометров «Spectord 40» в диапазоне длин волн 190-500 нм в кюветах с толщиной слоя 10 мм. Раствор сравнения – спирт этиловый 96%.

ЯМР-спектроскопия и масс-спектрометрия. Характеристики веществ, выделенных из сырья бархатцев отклоненных, с целью их идентификации определяли путем регистрации ¹H-ЯМР- спектров, полученных на приборе «JNM-ESX 400» (399.78 МГц) и спектров ¹³C-ЯМР – на приборе «JNM-ESX 400» (100.52 МГц).

Масс-спектры высокого разрешения были зарегистрированы на приборе «Bruker micrOTOF II» методом электрораспылительной ионизации (ESI). Измерения выполнены на положительных (напряжение на капилляре – 4500 V) ионах. Диапазон сканирования масс – m/z 50 – 3000, калибровка — внешняя или внутренняя (Electrospray Calibrant Solution, Fluka). Использовался шприцевой ввод вещества для растворов в метаноле, скорость потока – 3 мкл/мин. Газ-распылитель – азот (4 л/мин), температура интерфейса – 180 °С.

2.3.5. Технологические методы анализа

Для получения густого экстракта нами был предварительно получен жидкий экстракт. Его получали методом дробной модифицированной мацерации в течение 6 дней в соотношении «сырье-этанол 70%-й» 1:1 [9]. Очистку вытяжки

осуществляли методом отстаивания в температурном режиме не выше 10 °С в течении двух суток с последующей фильтрацией. Конечный продукт получали из жидкого экстракта путем упаривания под вакуумом при температуре 55 °С.

2.3.6. Фармакологические методы анализа

Определяли наличие диуретического и нейротропного действия густого экстракта соцветий бархатцев отклоненных, а также выделенных из экстракта флавоноидов. Была исследована также острая токсичность изучаемых нами объектов.

Изучение фармакологических активностей проводили на белых беспородных крысах обоего пола массой тела 200-220 г. Животных содержали в условиях вивария на обычном рационе при свободном доступе к воде. Для исследования животные были разделены на группы: 1) группа, получавшая исследуемые средства; 2) контрольная группа; 3) группа, получавшая препарат сравнения. При формировании контрольных и опытных групп использовался метод случайного отбора путем жеребьевки. Каждая группа состояла из десяти крыс. Все образцы вводились внутрижелудочно с помощью зонда [12]. Всего было поставлено восемь серий экспериментов – 5 опытных и 3 контрольных (по 10 животных в каждой серии). Статистическую обработку полученных результатов экспериментов проводили с использованием стандартных методов вариационной статистики при помощи программ Microsoft Excel 2010 «Пакет анализа» и Statistica 10.0 по критерию Манна – Уитни с поправкой Бонферрони.

Диуретическая активность

Предварительно за день до опыта животные получали внутрижелудочно водную нагрузку в объеме 3% от массы тела. В день опыта животным контрольной группы вводили внутрижелудочно аналогичную водную нагрузку. Опытные животные при помощи внутрижелудочного зонда получали лекарственный препарат в эквивалентном объеме воды. Густой экстракт вводили в дозе 10 мг/кг, БАВ патулетин и патулитрин – в дозе 1 мг/кг.

В качестве препаратов сравнения были взяты классические диуретики фуросемид в пороговой дозе 1 мг/кг (препарат сравнения для 4-х ч опытов) и

гипотиазид в эффективной средней терапевтической дозе 20 мг/кг (препарат сравнения для 24-х часовых опытов).

Животных помещали в обменные клетки на 24 ч. По истечении 4 и 24 ч собранные порции мочи подвергали исследованию. Определяли почечную экскрецию воды, а также концентрацию креатинина колориметрическим методом на фотоколориметре КФК-3.

Нейротропная активность

Исследование нейротропной активности густого экстракта соцветий бархатцев отклоненных, а также патулитрина проводили с использованием теста Порсолта [14, 47]. Данный тест предусматривает оценку двигательной активности крыс, помещенных в стеклянный цилиндр диаметром 20 см и высотой 40 см, на 1/3 заполненный водой с температурой 27 ± 1 °С. Животное помещали в цилиндр на 5 мин, регистрировали время активного и пассивного плавания, время иммобилизации. Увеличение времени активного плавания и уменьшение времени иммобилизации рассматривали как антидепрессантный эффект. Тест проводили спустя 2 ч после введения густого экстракта и БАС.

При изучении нейротропной активности исследуемый густой экстракт и флавоноид вводили однократно внутрижелудочно через зонд на фоне 1% водной нагрузки. Дозы исследуемых образцов подбирались экспериментальным путем.

Исследование острой токсичности

Изучалась для густого экстракта соцветий бархатцев отклоненных. Формировали две группы (опытная и контрольная) лабораторных животных обоего пола, по десять крыс в каждой. Опытные группы получали в дозе 1 г/кг густой экстракт на фоне 3% водной нагрузки (вводили внутрижелудочно), а контрольная группа получала в аналогичных условиях воду очищенную. Непрерывное наблюдение за животными обеих групп осуществляли в первый день эксперимента. Общая продолжительность исследования составила 14 дней. С учетом результатов наблюдений за животными густой экстракт из соцветий бархатцев отклоненных относили к одному из классов токсичности.

Исследования проводили на кафедре фармакологии имени заслуженного деятеля науки РФ профессора Алексея Александровича Лебедева ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.

ГЛАВА 3. АНАТОМО-ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ЦВЕТКОВ И ОБЁРТКИ СОЦВЕТИЙ БАРХАТЦЕВ ОТКЛОНЁННЫХ

С целью определения диагностических признаков нового вида сырья, был проведен морфолого-анатомический анализ язычковых и трубчатых цветков, а также обертки соцветий.

3.1. Язычковые цветки

При рассмотрении с поверхности язычковых цветков в области отгиба венчика с адаксиальной (верхней) стороны эпидермис густо покрыт конусовидными одноклеточными волосками – папиллами (рис. 2 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.

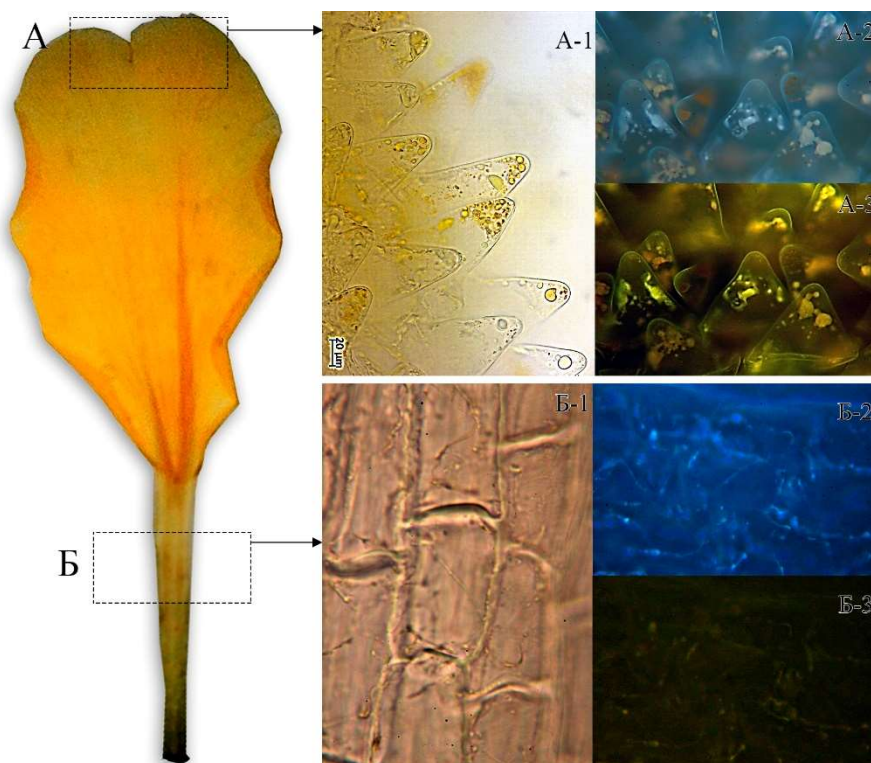


Рисунок 2 – Верхний эпидермис язычкового цветка: А – папиллы отгиба венчика, Б – клетки эпидермы трубки венчика.

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

При облучении выростов УФ-светом с $\lambda=366\text{нм}$ 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 $\lambda=366\text{ нм}$ наблюдается слабое свечение в основном за счет кутикулы на поверхности (рис. 2, 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. 3, А-2)

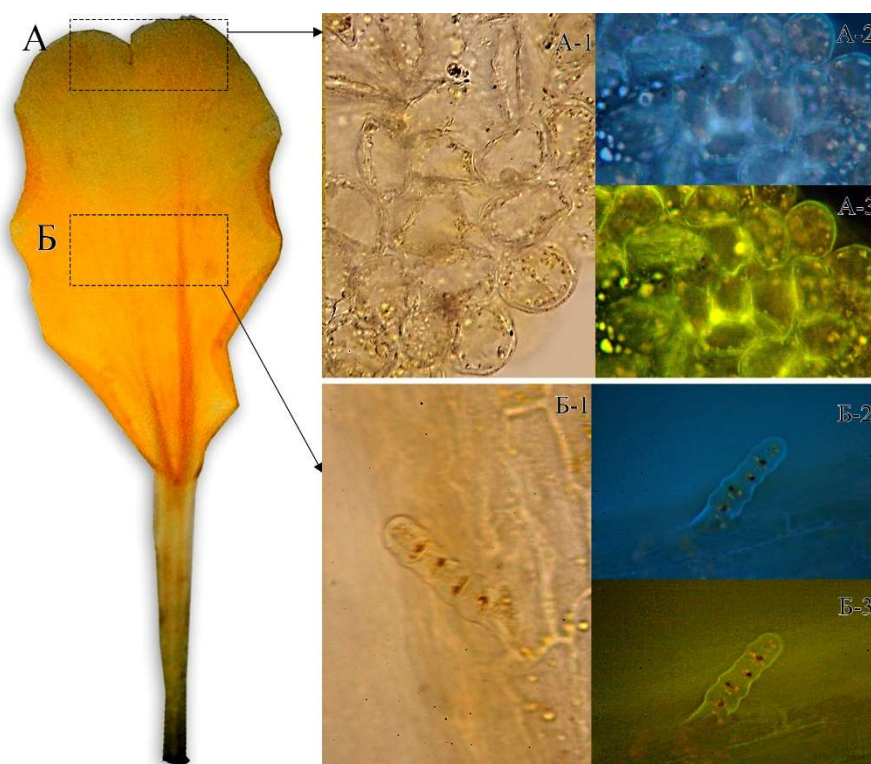


Рисунок 3 – Нижний эпидермис язычкового цветка: А – папиллы отгиба венчика, Б – простые многоклеточные гусеницеобразные волоски.

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

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 гусенице-видные волоски. Протопласты их клеток пигментированы желто-оранжевыми аморфными структурами, сохраняющими окраску при облучении УФ-светом с $\lambda=366\text{нм}$, а также светом с $\lambda=420\text{ нм}$. Волнистая кутикула описанных трихом люминесцирует голубым цветом при 366 нм на фоне слабо светящихся клеток основной эпидермы (рис. 3, Б-2).

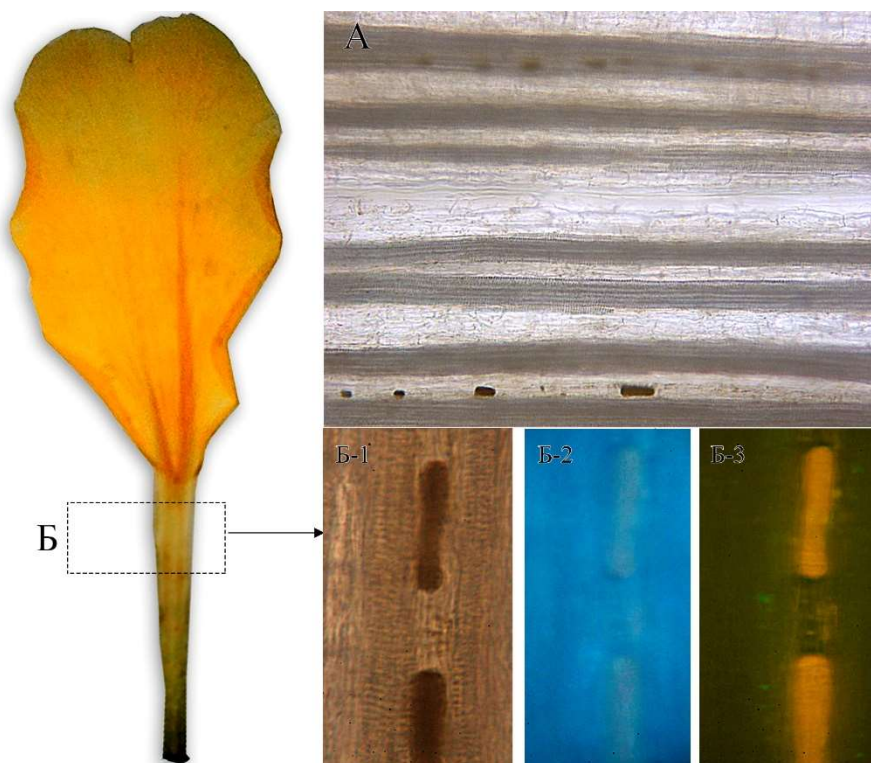


Рисунок 4 – Млечники трубки венчика язычкового цветка: А – поверхность трубки венчика (x100), Б – метаболиты млечника во флоэмной части (x400).

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

При рассмотрении поверхности трубки венчика язычкового цветка на просвете видны проводящие элементы жилок. В структуре жилок со стороны

флоэмной части заметны млечные каналцы с пигментированным млечным соком, разбитым в каналцах на фрагменты тёмно-бурого цвета (рис. 4 А.)

При облучении пигментированных фрагментов млечного сока выявлено яркое свечение при 420 нм (рис. 4, Б-3). При облучении УФ-светом $\lambda=366\text{нм}$ свечение млечного сока светло-розовое слабо заметное из-за голубой люминесценции кутикулы эпидермальных клеток (рис. 4, Б-2).

3.2. Трубоччатые цветки

Поверхность отгиба венчика трубчатого цветка с адаксиальной (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 $\lambda=366\text{нм}$ жирные капли светятся слабо, сохраняя яркую окраску (рис. 5, А-2).

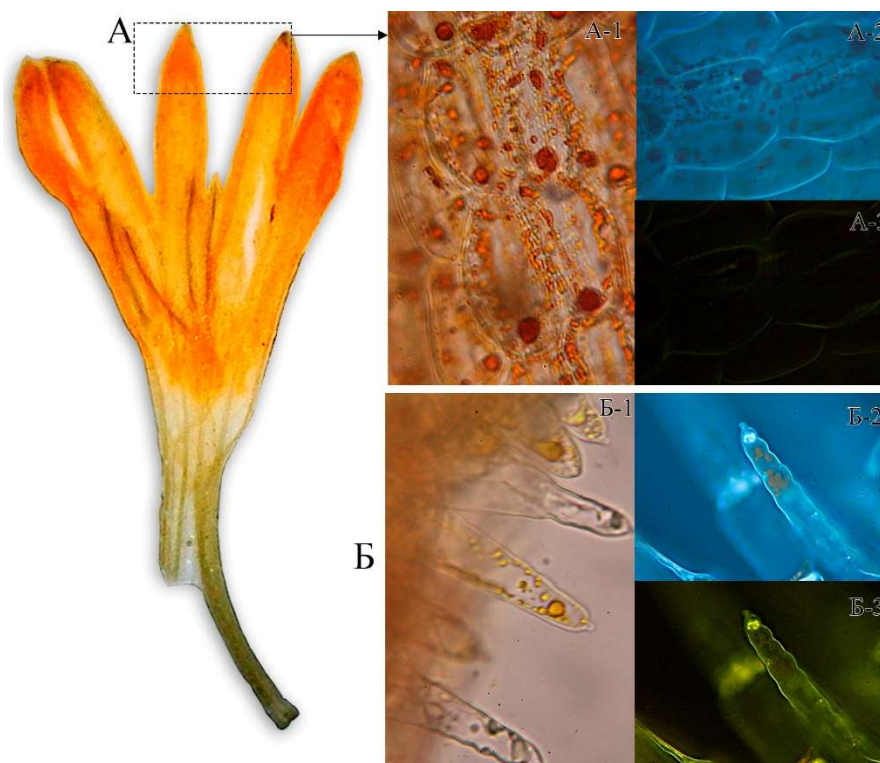


Рисунок 5 – Верхний эпидермис отгиба венчика трубчатого цветка: А – эпидермальные клетки отгиба венчика (x400), Б – простые волоски (x400).

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

Поверхность отгиба венчика значительно опушена простыми вытянутыми волосками. Клеточные стенки волосков тонкие волнистые с характерной голубой люминесценцией при облучении светом с $\lambda=366\text{нм}$ и желтой люминесценцией при 420 нм (рис. 5, Б-2, Б-3). Протопласты волосков аналогично папиллам на отгибе язычковых цветков имеют многочисленные пигментированные капли, сохраняющие цвет при облучении УФ-светом с $\lambda=366\text{нм}$.

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 (рис. 6, А-1).

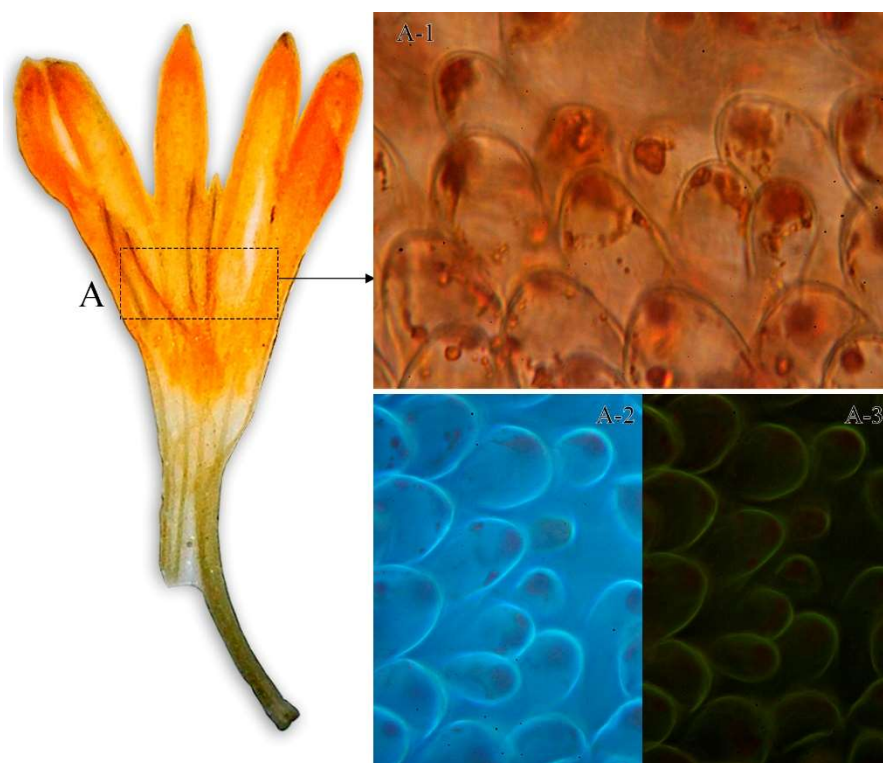


Рисунок 6 – Верхний эпидермис поверхности венчика трубчатого цветка: А – папиллы эпидермальной поверхности (x400).

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

С абаксиальной (нижней) стороны в области отгиба венчика опушение трихомами в основном локализовано по краю лепестков венчика, что хорошо заметно при рассмотрении сине-голубой люминесценции волосков в УФ-свете с

$\lambda=366\text{nm}$ (рис. 7, 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. 7, Б).

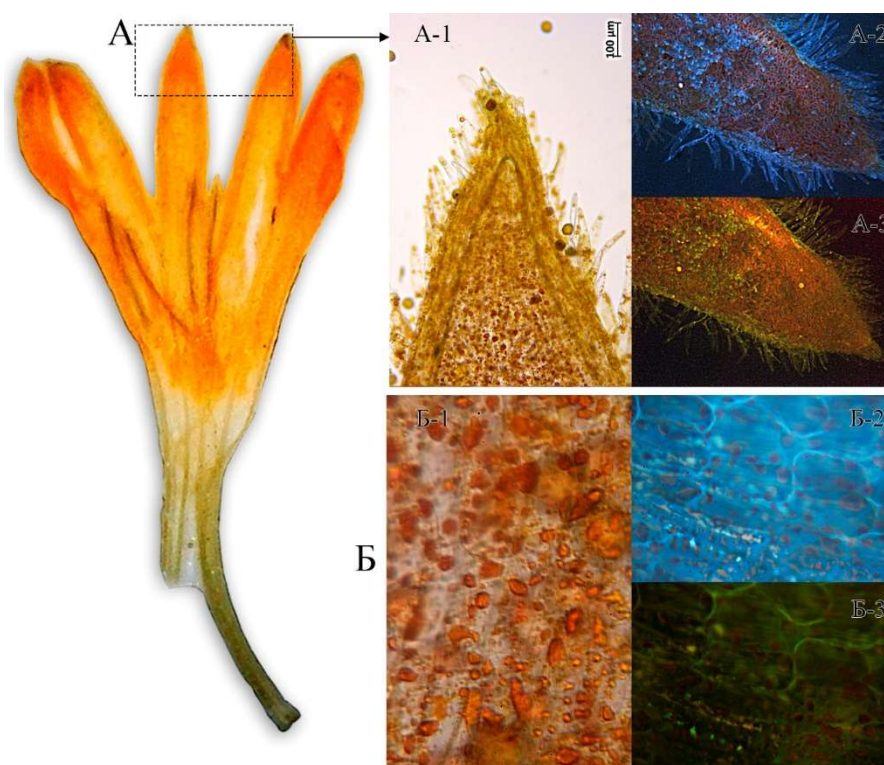


Рисунок 7 – Нижний эпидермис поверхности венчика трубчатого цветка: А – Опушение отгиба венчика (x100), Б – клетки эпидермы отгиба венчика (x400).
Обозначения: 1 – видимая область спектра, 2 – УФ-свет с $\lambda=366\text{nm}$, 3 – УФ-свет с $\lambda=420\text{nm}$.

Люминесценция клеток эпидермы абаксиальной стороны аналогична описанным выше клеткам отгибав венчика с адаксиальной (верхней) стороны (рис. 7, 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 (рис. 8).

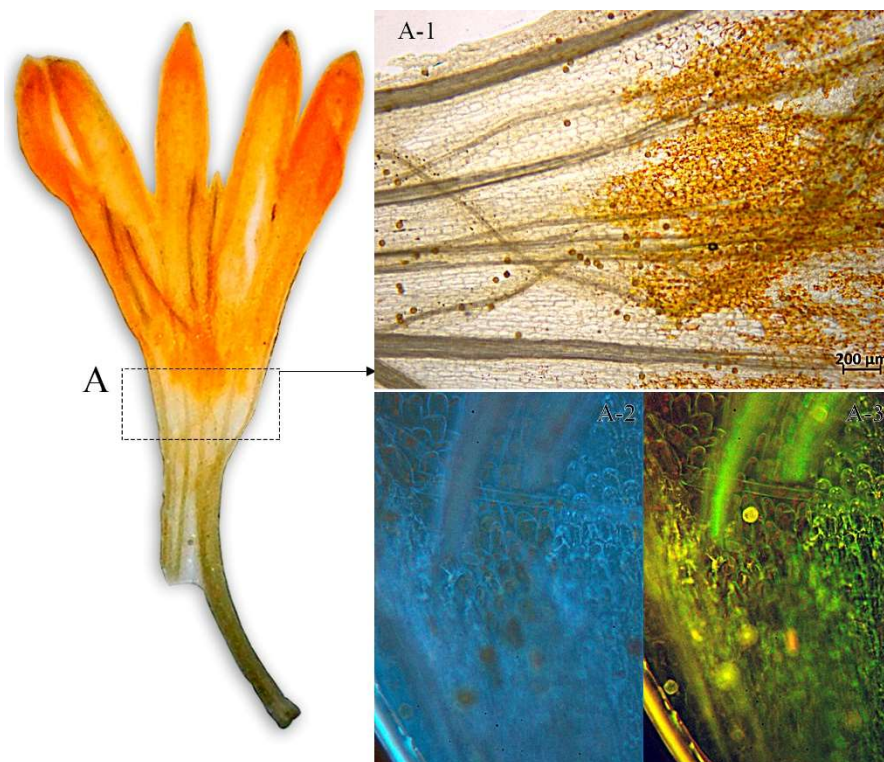


Рисунок 8 – Эпидермис трубки венчика трубчатого цветка: А – Фрагмент трубки венчика (x100).

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

3.3. Гинецей и андроцей обоих цветков соцветия

В структуре сырья диагностируются элементы гинецея в виде столбика пестика с рыльцами. В язычковых цветках столбик тонкий, прямой у основания не пигментированный. К верхушке раздваивается и имеет ярко-оранжевую пигментацию клеток (рис. 9).

Отдельные рыльца пестика сильно опушены и имеют веерообразную форму загибаясь к основанию пестика. Многочисленное опушение рыльца представлено длинными одно и двух-клеточными трихомами с пигментированным протопластом (рис. 9, А-1). Трихомы люминесцируют за счет оболочек клеток голубым цветом при 366 нм и ярко-желтым при 420 нм, (рис. 9, А-3). Столбик пестика слабо окрашен и сложен из тонкостенных прямоугольных клеток со слабо структурированным протопластом. На просвете столбика видны сосудистые элементы жилок, люминесцирующие за счет лигнифицированных оболочек светло-

голубым цветом при 366нм и ярко-желтым цветом при 420 нм (рис. 9 Б, Б-1, Б-2, Б-3).

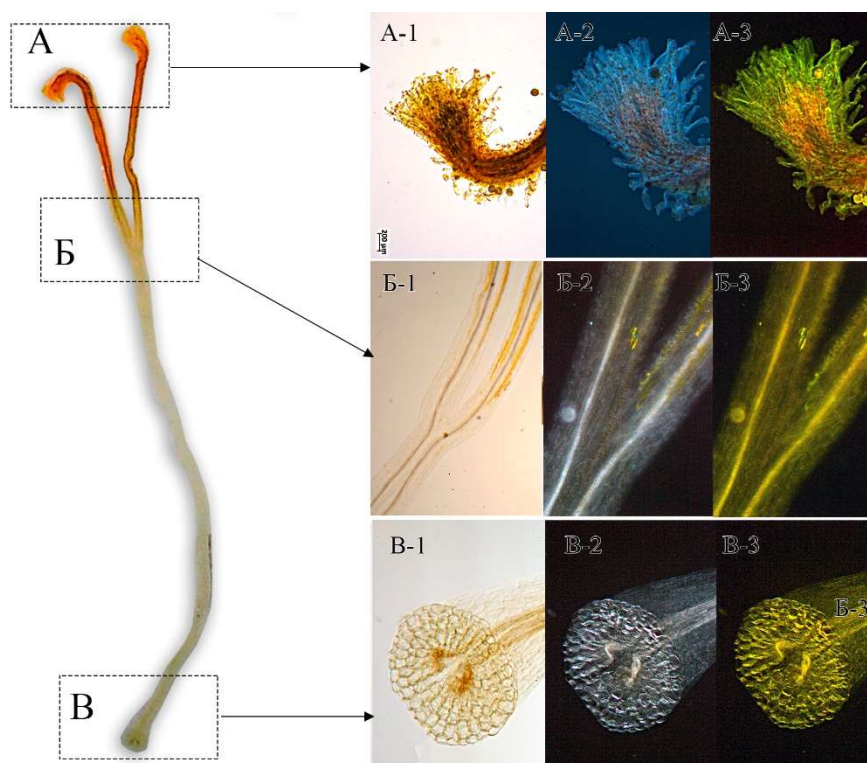


Рисунок 9 – Гинецей язычкового цветка: А – рыльце пестика, Б – раздвоение столбика, В – основание столбика пестика.

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

Основание столбика пестика несколько более расширено чем основная его толщина. Основание имеет вид округлой площадки, оформленной из совокупности округлых клеток с заметно утолщенными светло-желтыми клеточными стенками, люминесцирующими за счет лигнификации оболочек светло-голубым цветом при 366 нм и ярко-желтым цветом при 420 нм (рис. 9, В-1, В-2, В-3).

У трубчатых цветков соцветия бархатцев столбики гинецея, аналогично язычковым цветкам раздваиваются, однако могут встречаться столбики с тремя рыльцами (рис. 10). Анатомо-гистологически гинецеи обоих типов цветков отличаются слабо. Основное отличие в форме рылец. В отличие от веерообразной формы у язычковых цветков, рыльца трубчатых цветков прямые к вершине остро-

конусные. Опушение рылец гинецеев трубчатых цветков более протяженное по их длине (рис. 10 А).

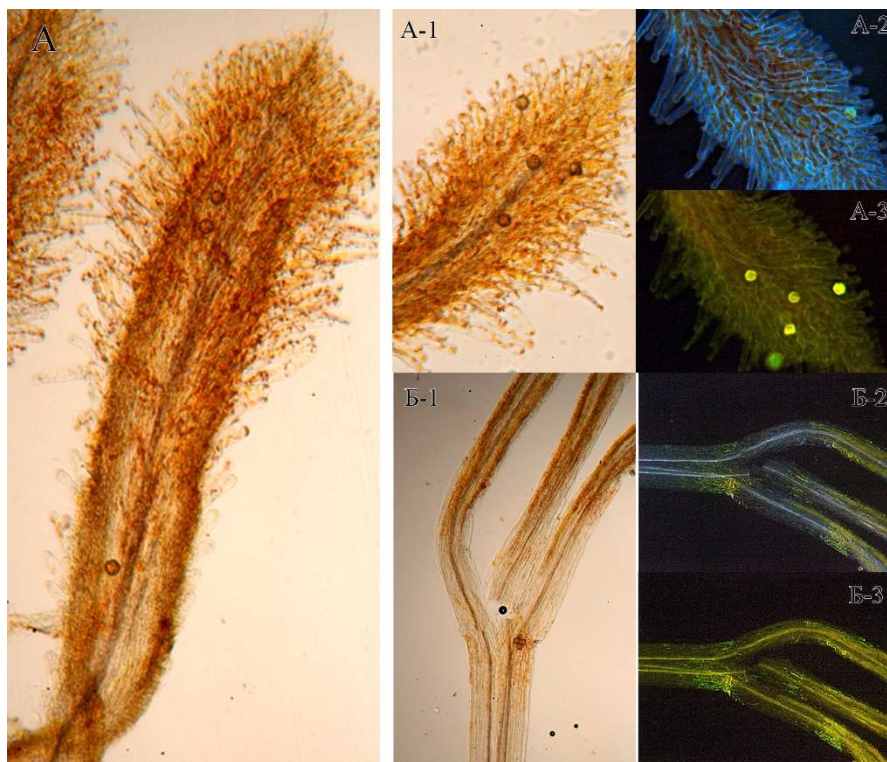


Рисунок 10 – Гинецей трубчатого цветка: А – Фрагмент рыльца пестика, Б – три столбика пестика.

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

Андроцеи обоих типов цветков соцветий бархатцев не отличаются друг от друга. Теки пыльников вытянутые стреловидные. К вершине теки заострённые. Клетки тек пыльников не однородные по структуре клеточных стенок, расположены рядами. Клетки, имеющие лигнифицированные оболочки хорошо заметны по характерной люминесценции светло-голубым цветом при 366 нм и ярко-желтым цветом при 420 нм (рис. 11, А-1, А-2).

Связник сложен из прямоугольных клеток с сильно утолщенными клеточными стенками. Часть связника значительно выходит за пределы тек пыльника ниже его основания, соединяясь с тычиночными нитями, сложенными из тонкостенных клеток (рис. 11, Б).

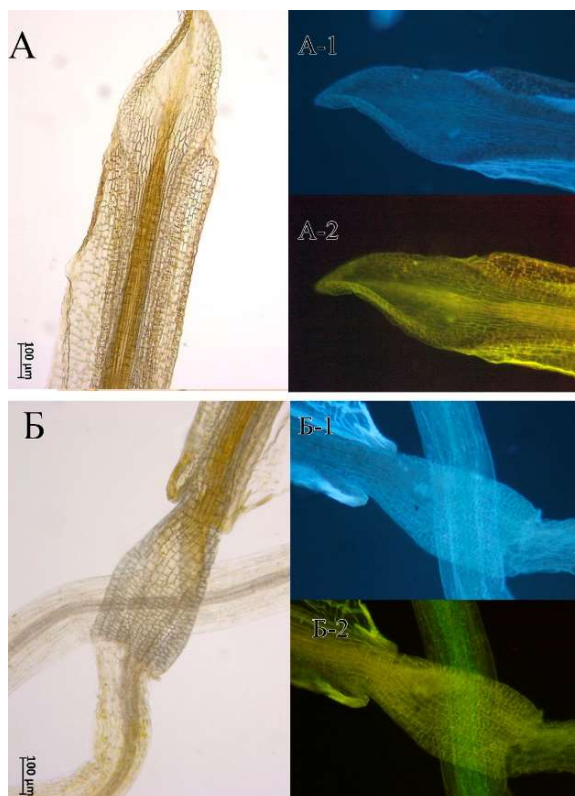


Рисунок 11 – Андроцей цветков: А – теки пыльников, Б – связник.

Обозначения: 1 – УФ-свет с $\lambda=366\text{нм}$, 2 – УФ-свет с $\lambda=420\text{нм}$.

3.4. Обёртка соцветия

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 сложен из двух плотных слоёв склеренхимных волокон, что заметно при рассмотрении на поперечном сечении. Клеточные стенки волокон склерифицированы и имеют характерную люминесценцию (рис. 12, Б-2, Б-3).

Под эпидермисом на просвете хорошо заметны крупные светло-желтые вместилища овальной формы с жирными каплями оранжево-красной окраски, локализованные, как правило, по периферии вместилища (рис. 12, А-1). При облучении светом с $\lambda=420\text{нм}$ жирные капли имеют ярко-оранжевую люминесценцию. В УФ-свете они не заметны (рис. 12, А-2, А-3).

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 $\lambda=366\text{нм}$.

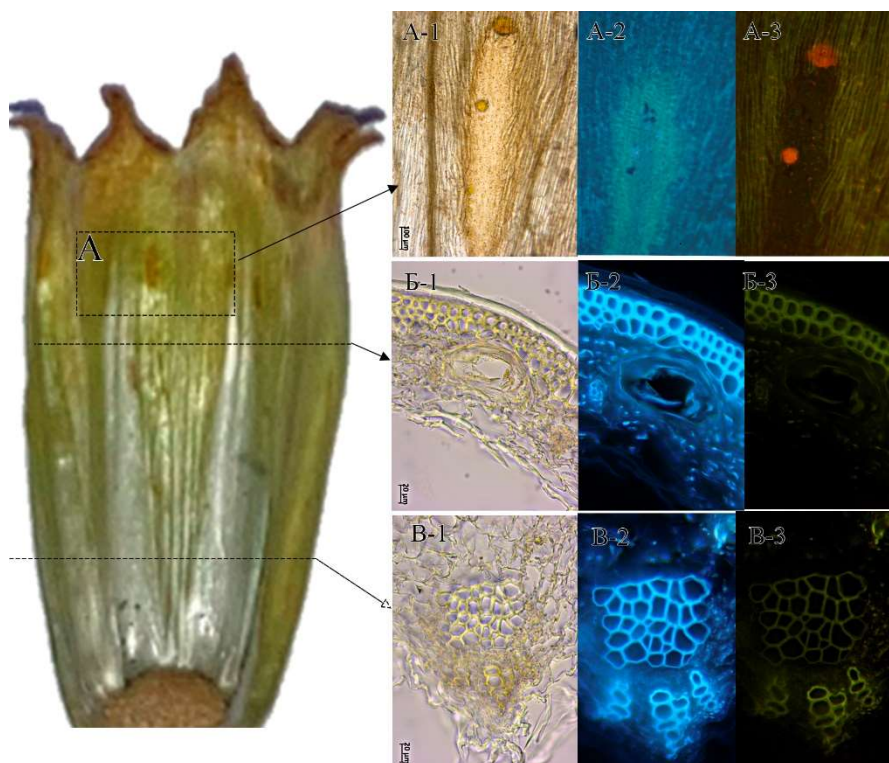


Рисунок 12 – Обёртка соцветия: А – фрагмент обёртки с вместилищем (x400), Б – вместилище на поперечном сечении обёртки (x400), В – проводящий пучок на поперечном сечении обёртки (x400).

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

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 не правильную угловатую форму без межклетников (рис. 12 В). Проводящие элементы ксилемы сгруппированы в три ряда сосудов, что имеет характерную картину пучка, специфическую для описанного вида. Люминесценция тканей пучков в основном за счет лигнифицированных элементов: сосудов ксилемы и склеренхимы - светло-голубая при 366 нм и ярко-желтая при 420 нм (рис. 12, В-2, В-3).

3.5. Пыльца

По поверхности околоцветника, а также преимущественно в структуре и на поверхности тек пыльников диагностируются пыльцевые зёрна. Они имеют нативно коричнево-желтую окраску и характерную шиповатую структуру (рис. 13).

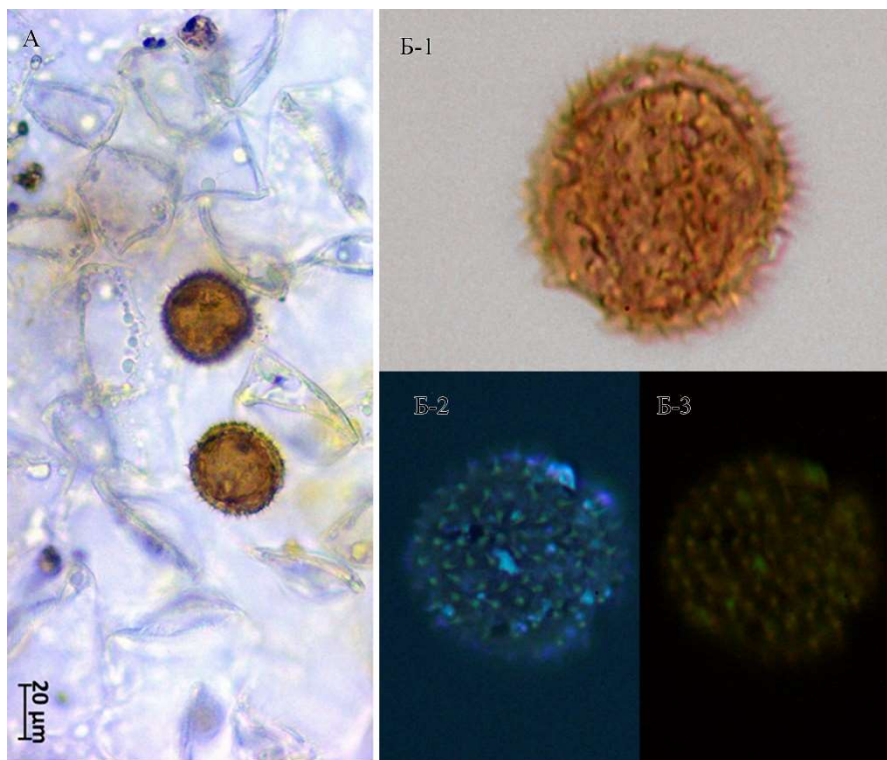


Рисунок 13 – Пыльца цветков: А – пыльца на отгибе венчика (x100), Б – одиночное пыльцевое зерно (x400).

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

Согласно литературным данным, пыльцевые зерна трёх-бороздно-оровые, сфероидальные [31]. Структура поверхности пыльцевых зерен шиповатая. Шипы не очень крупные узко-конические до 4 мкм в высоту. Шипы широкие в основании резко суженные к вершине. Многочисленные шипы равномерно расположены по поверхности, почти в плотную примыкая друг к другу [31].

При облучении пыльцевых зёрен УФ-светом с $\lambda=366\text{нм}$ наблюдается голубое свечение вершин шипов. Остальное тело пыльцевого зерна люминесценции в данных условиях облучения не даёт.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. К анатомо-гистологическим особенностям имеющим диагностическое значение для соцветий бархатцев можно отнести: 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; веерообразная 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. Выявленные свечения протопластов эпидермальных клеток, трихом и папилл отгиба венчика характерны для пигментов группы каротина и ряда веществ фенольной природы. В целом, люминесцентные особенности могут быть использованы в диагностике соцветий бархатцев отклонённых.

ГЛАВА 4. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЕЩЕСТВ ИЗ СОЦВЕТИЙ И ТРАВЫ БАРХАТЦЕВ ОТКЛОНЕННЫХ

С целью изучения компонентного состава соцветий и травы *Tagetes patula* L. нами было проведено выделение индивидуальных веществ методом адсорбционной колоночной хроматографии.

4.1. Выделение индивидуальных веществ из изучаемых видов сырья

Для этих целей нами было получено методом дробной модифицированной мацерации извлечение из 150 г соцветий бархатцев отклоненных сорта «Мандарин» с помощью 70 % этилового спирта в соотношении 1:5, которое упаривали под вакуумом, наносили на силикагель L 40/100 и высушивали.

Экстракт травы получали из 110 г сырья сорта «Оранжевое пламя» с использованием этилового спирта 70% концентрации в соотношении «сырьё-экстрагент» – 1:10.

В качестве элюентов использовали хлороформ, а также смеси хлороформа и этилового спирта в различных соотношениях. Элюаты делили на фракции одинакового объема по 200 мл и упаривали на ротационно-вакуумной установке до объема 10 мл (табл. 5).

Таблица 5 – Схема элюирования фракций из экстрактов соцветий и травы *T. patula* L.

№ фракций <i>экстракта соцветий</i>	№ фракций <i>экстракта травы</i>	Состав элюента, %		Объем элюента для <i>экстракта соцветий</i> , мл	Объем элюента для <i>экстракта травы</i> , мл
		Хлороформ	Этанол 96%		
1-2	1-2	100	0	500	500
3-7	–	99	1	500	–
8-14	3-6	97	3	500	500
15-26	7-14	95	5	1000	500
27-37	15-21	93	7	1000	1000

38-49	22-28	90	10	1000	1000
50-62	29-34	85	15	1000	1000
63-73	35-41	80	20	1000	1000
74-84	42-52	70	30	1000	1000
85-102	53-59	60	40	1500	1000
103-111	60-65	50	50	1000	1000
119-127	–	0	100	1000	–

При проведении исследования эффективность разделения веществ контролировали по изменению интенсивности окраски фракций во время элюирования визуально и с помощью ТСХ в системе растворителей хлороформ-этанол 96%-вода в соотношении 25:18:2.

4.2. Идентификация индивидуальных соединений соцветий бархатцев отклоненных.

Вещество **1** из соцветий бархатцев отклоненных удалось выделить из фракций, полученных элюированием смесью хлороформа и этилового спирта соотношении 60:40. Выделенное доминирующее вещество с величиной R_f около 0,4 подверглось очистке перекристаллизацией.

Соединение **2** получено из фракций №38-49 той же колонки и имеет величину R_f около 0,7. Очистка соединения осуществлялась перекристаллизацией.

В минорных количествах обнаружено вещество **3** во фракциях №31 и 32. Данное соединение имеет некристаллическую структуру.

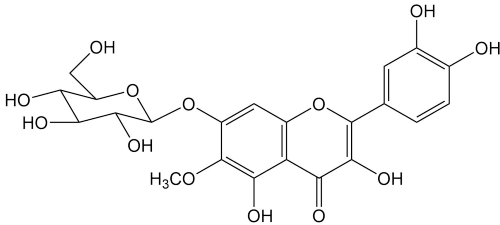
Во фракциях №81-88 обнаружено вещество **4**. Элюент – хлороформ и этанол 96% в соотношениях 70:30 и 60:40. Данные фракции были объединены в одну и подвержены рехроматографической очистке на полиамиде. Элюирование веществ в хроматографической колонке проводили смесями воды и 96% этанола в различных соотношениях (20 %; 40 %; 70 %; 96 %). В результате операции рехроматографирования выделено вещество **4** (элюенты – спирт этиловый 40 % и 70 % концентрации).

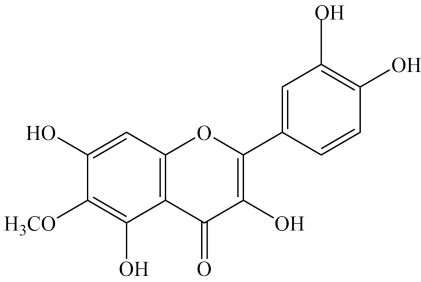
В минорных количествах выделено вещество **5** из фракций №38-49 основной колонки. Данное БАС было обнаружено вместе с соединением **2**, основным выделенным веществом из указанных фракций.

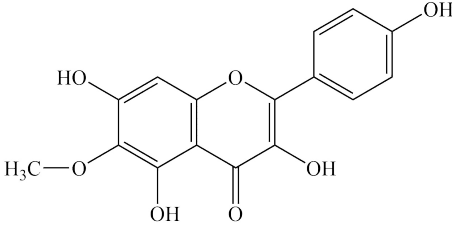
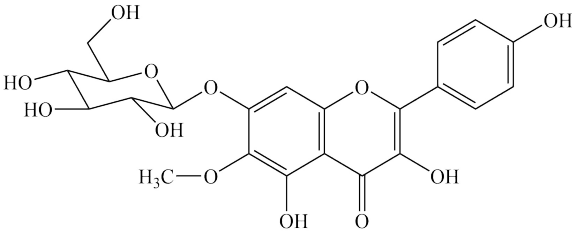
Из фракций, полученных элюированием смесью хлороформа и этанола в соотношении 97:3 выделено соединение **6**. Очистку проводили обработкой этиловым спиртом 96% и последующей перекристаллизацией. На ТСХ пластинке данное вещество имеет значение R_f около 0,81 и детектируется при просмотре в УФ-свете при длине волны 365 нм – имеет голубое свечение.

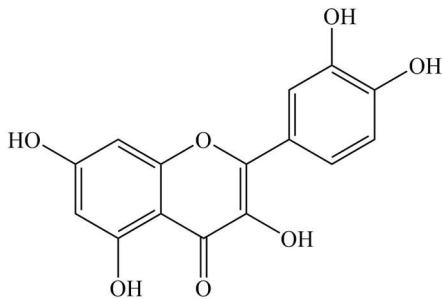
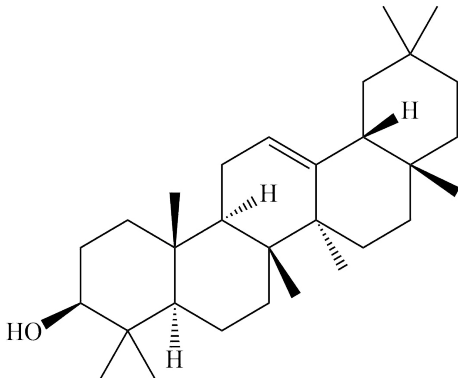
Идентификацию выделенных соединений проводили на основании данных УФ-, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии (Приложение 3). Спектральные характеристики веществ указаны в таблице 6.

Таблица 6 – Физико-химические характеристики индивидуальных соединений, содержащихся в соцветиях бархатцев отклоненных

№ п/п	Название и химическая формула соединения	Характеристики вещества
1.	<p style="text-align: center;">Патулитрин (7-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидрокси-6- метоксифлавона)</p> 	<p>Кристаллическое вещество ярко желтого цвета состава $\text{C}_{22}\text{H}_{22}\text{O}_{13}$ с т. пл. 250-252 °С (спирт этиловый).</p> <p>УФ-спектр: $\lambda_{\text{max}}^{\text{EtOH}}$ 266, 382 нм; + NaOAc 266, 384 нм; + NaOAc + H_3BO_3 272, 400 нм; + AlCl_3 276, 382пл., 443 нм; + AlCl_3 + HCl 275, 382пл., 438 нм; + NaOMe 303, 373, 445(пл.) нм.</p> <p>^1H-ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO-d_6, δ, м.д., J/Гц): 12.47 (1H, с, 5-OH-группа), 9.48 (3H, уш. с, 3-OH-группа, 7-OH-группа и 4'-OH-группа), 7.70 (1H, д, 2.5 Гц, H-2'), 7.52 (1H, дд, 2.5 и 8.5 Гц, H-6'), 6.92 (1H, с, H-8), 6.88 (1H, д, 8.5 Гц, H-5'), 5,11 (1H, д, J = 7,12, H-1'' глюкопиранозы), 3,75</p>

		<p>(3H, c, OCH₃ при C-6), 3,3-4,6 (6H глюкопиранозы).</p> <p>¹³C-ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO-d₆, δC, м.д.): 176.66 (C-4), 156.89 (C-7), 151.94 (C-5), 151.58 (C-9), 148.43 (C-4'), 148.22 (C-3'), 145.49 (C-3), 135.31 (C-6'), 132.32 (C-2'), 122.39 (C-1'), 120.56 (C-6), 116.08 (C-2), 115.93 (C-5'), 104.12 (C-10), 100.64 (C-1'' глюкозы), 94.38 (C-8), 77.75 (C-5'' глюкозы), 77.20 (C-3'' глюкозы), 73.72 (C-2'' глюкозы), 70.08 (C-4'' глюкозы), 61.15 (C-6'' глюкозы), 60.86 (CH₃O при C-6).</p> <p>HR-ESI-MS, 180 °C, <i>m/z</i>: 495.1133 [M+H]⁺, <i>m/z</i> 517.0940 [M+Na]⁺.</p>
2.	<p style="text-align: center;">Патулетин (3,5,7,3',4'-пентагидрокси-6-метоксифлавои)</p> 	<p>Кристаллическое вещество ярко желтого цвета состава C₁₆H₁₂O₈; т.пл. 265-267 °C (водный спирт).</p> <p>УФ-спектр: λ_{max}^{EtOH} λ_{max} EtOH 264, 296нм., 378 нм; +NaOAc 268, 382 +NaOAc + H₃BO₃ 270, 396; +AlCl₃ 274, 381нм., 438 нм; +AlCl₃ + HCl 275, 381нм., 436 нм; + NaOMe 328, 368нм., 428(нм.) нм.</p> <p>¹H-ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12.54 (1H, c, 5-OH-группа), 10.65 (1H, c, 7-OH-группа), 9.56 (1H, c, 4'-OH-группа), 9.32 (1H, c, 3-OH-группа), 7.64 (1H, д, 2.5 Гц, H-2'), 7.50 (1H, дд, 2.5 и 8.5 Гц, H-6'), 6.85 (1H, д, 8.5 Гц, H-5'), 6.48 (1H, c, H-8), 3.73 (3H, c, OCH₃ при C-6).</p> <p>¹³C-ЯМР спектр (100.52 МГц, ДМСО-d₆, δC, м.д.): 176.56 (C-4), 157.50 (C-7), 152.27 (C-5), 151.84 (C-9), 148.24 (C-4'), 147.46 (C-3'), 145.49 (C-3), 135.31 (C-6'), 132.32 (C-2'), 122.39 (C-1'), 120.56 (C-6), 116.08 (C-2),</p>

		<p>115.93 (C-5'), 104.12 (C-10), 60.52 (CH₃O при C-6).</p> <p>HR-ESI-MS, 180 °C, <i>m/z</i>: 333.0605 [M+H]⁺, 355.0424 [M+Na]⁺, 371.0164 [M+K]⁺</p>
3.	<p>6-метоксикемпферол (3,5,7,4'-тетрагидрокси-6-метоксифлавонон)</p> 	<p>Аморфное вещество желто-оранжевого цвета состава C₁₆H₁₂O₇; т.пл. 269-271 °C.</p> <p>УФ-спектр (EtOH, λ_{max}, нм): 275, 372; +NaOAc 278, 379 +NaOAc + H₃BO₃ 278, 380; +AlCl₃ 278, 431; +AlCl₃ + HCl 278, 431; + NaOMe 285, 427.</p> <p>Спектр ЯМР ¹H (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12.53 (1H, с, 5-ОН-группа), 10.65 (1H, с, 7-ОН-группа), 10.07 (1H, с, 4'-ОН-группа), 9.35 (1H, с, 3-ОН-группа), 7.99 (2H, д, J = 9.0, H-2' и H-6'), 6.88 (2H, д, J = 9.0, H-3' и H-5'), 6.50 (1H, с, H-8), 3,71 (3H, с, 6-OCH₃ при C-6).</p>
4.	<p>7-О-β-D-гликопиранозид 6-метоксикемпферола (7-О-β-D-гликопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-6-метоксифлавонона)</p> 	<p>Аморфное вещество желтого цвета состава C₂₂H₂₂O₁₂.</p> <p>УФ-спектр (EtOH, λ_{max}, нм): 274, 372 нм; +NaOAc 274, 372; +NaOAc + H₃BO₃ 278, 380; +AlCl₃ 278, 426; +AlCl₃ + HCl 278, 426; + NaOMe 284, 425.</p> <p>Спектр ЯМР ¹H (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12.60 (1H, с, 5-ОН-группа), 9.43 (2H, уш. с, 3-ОН-группа и 4'-ОН-группа), 8.03 (2H, д, J = 9.0, H-2' и H-6'), 6.94 (2H, д, J = 9.0, H-3' и H-5'), 6.91 (1H, с, H-8), 5.24 (1H, д, J = 7.0, H-1'' гликопиранозы), 3.71 (3H, с, 6-OCH₃ при C-6), 3.4-5.0 (6H гликопиранозы).</p> <p>Спектр ЯМР ¹³C (100.52 МГц, DMSO-d₆, δ_C, м.д.): 176.65 (C-4), 159.93 (C-7), 156.89 (C-</p>

		<p>5), 151.95 (C-9), 148.44 (C-2), 145.59 (C-4'), 136.28 (C-3), 132.32 (C-6), 130.18 (C-2' и C-6'), 122.39 (C-1'), 115.98 (C-3' и C-5'), 104.32 (C-10), 100,71 (C-1'' глюкозы), 94.32 (C-8), 77,76 (C-5'' глюкозы), 77.21 (C-3'' глюкозы), 73.50 (C-2'' глюкозы), 70.08 (C-4'' глюкозы), 60.86 (C-6'' глюкозы), 56.57 (CH₃O при C-6).</p> <p>HR-ESI-MS, 180 °C, <i>m/z</i>: 479.1164 [M+H]⁺, 501.1003 [M+Na]⁺, 517.0963 [M+K]⁺.</p>
<p>5.</p>	<p>Кверцетин (3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавонон)</p> 	<p>Ярко-желтое кристаллическое вещество состава C₁₅H₁₀O₇ с т.пл. 310-312 °C. УФ-спектр (EtOH, λ_{max}, нм): 257, 268 пл, 375; + NaOAc 274, 380; +NaOAc + H₃BO₃ 274, 398; +AlCl₃ 270, 430; +AlCl₃ + HCl 270, 410.</p> <p>Спектр ЯМР ¹H (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12.45 (1H, с, 5-OH), 10.72 (1H, с, 7-OH-группа), 9.54 (1H, с, 4'-OH-группа), 9.32 (1H, с, 3'-OH-группа), 9.26 (1H, с, 3-OH- группа), 7.64 (1H, д, J = 2.5, H-2'), 7.51 (дд, J = 2.5 и J = 9.0, H-6'), 6,83 (1H, д, J = 9.0, H-5'), 6.37 (1H, д, J = 2.5, H-8), 6.15 (1H, д, J = 2.5, H-6).</p>
<p>6.</p>	<p>β-амирин</p> 	<p>Кристаллическое вещество белого цвета состава C₃₀H₅₀O; т.пл. 196-198 °C.</p>

Соединения **1** и **2** идентифицированы как патулитрин и его агликон – патулетин. Эти флавоноиды являются доминирующими для соцветий бархатцев отклоненных.

Впервые для исследуемого вида сырья выделены флавоноиды **3** и **4**. По результатам исследований эти соединения идентифицированы как 6-метоксикемпферол (3,4',5,7-тетрагидрокси-6-метоксифлавонон) и его гликозид 7-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-6-метоксифлавонона, соответственно. Данные БАС ранее не были обнаружены в цветках бархатцев отклоненных или других видах рода *Tagetes* L.

Соединение **5** представляет собой кверцетин, описанный ранее для цветков бархатцев отклоненных. Это соединение содержится в соцветиях бархатцев отклоненных в минорных количествах.

В сырье также обнаружены сапонины, доминирующим из которых является соединение **6**, идентифицированное как β-амирин. Это вещество ранее было обнаружено в цветках другого вида бархатцев – *Tagetes erecta* L. [91, 92]. Из изучаемого нами сырья β-амирин выделен впервые. Во фракциях, из которых было выделено это соединение, были также обнаружены примеси лупеола.

4.3. Идентификация БАС, выделенные из травы бархатцев отклоненных

Доминирующим в данном виде сырья являются соединения, представляющие собой светло-желтый аморфный порошок. Фракции, в которых обнаружены эти соединения (№ 46-49, полученные элюированием смеси хлороформ-этанол в соотношении 70 и 30), были объединены в одну фракцию. В дальнейшем объединенная фракция была подвержена рехроматографической очистке на полиамиде. Элюирование веществ проводили смесями воды и 96% этанола в различные соотношения (20 %; 40 %; 70 %; 96 %). Очищенные вещества были получены элюированием 20% этанолом. Получена смесь веществ **7** и **8**.

Соединение **9** было получено методом рехроматографической очистки на сефадексе объединенных, предварительно очищенных ацетоном фракций № 53-57. Элюирование веществ с хроматографической колонки проводили смесями хлороформа и спирта этилового 96% в различных концентрациях (чистый

хлороформ, 10%, 20%, 30%, 40% спирт в хлороформе, этанол 96%). С хроматографической колонки получили вещество **9** (элюент - 30 % раствор 96% этилового спирта в хлороформе).

Полученные соединения были подвержены кислотному и ферментативному гидролизу с целью получения агликонов. В результате проведенного гидролиза нами были выделены и очищены агликоны **10** и **11**.

Вещества **12**, **13** и **14** были выделены в результате рехроматографической очистки на полиамиде объединенных фракций № 23-27 основной колонки. Элюирование проводили смесями воды и 96% этанола в различных соотношениях. Вещества **12** и **13** были получены элюированием 40% этанолом, соединение **14** – 70% этанолом.

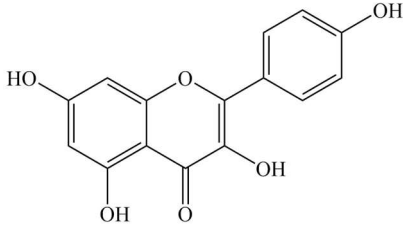
Вещества **15** и **16** выделены совместно из фракций № 28-33 основной колонки. Смесь веществ представляет собой белый кристаллический порошок. Очистку проводили перекристаллизацией.

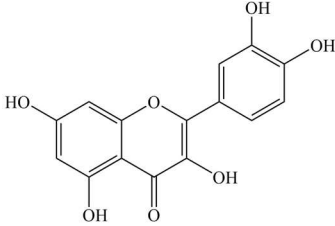
Характеристики веществ, выделенных из экстракта стеблей и листьев *Tagetes patula* L., приведены в таблице 7.

Таблица 7 – Физико-химические характеристики биологически активных соединений, содержащихся в траве бархатцев отклоненных

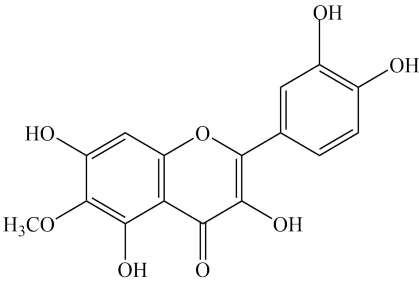
№ п/п	Название и химическая формула соединения	Характеристики вещества
7.	3-O-α-L-рамнопиранозид-7-O-α-L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидроксифлавона	Аморфное вещество светло-желтого цвета состава C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄ . УФ-спектр (EtOH, λ_{max} , нм): 269, 372 нм; +NaOAc 269, 372; +NaOAc + H ₃ BO ₃ 278, 373; +AlCl ₃ 278, 426; +AlCl ₃ + HCl 278, 426; + NaOMe 284, 425. Спектр ЯМР ¹ H (399.78 МГц, DMSO-d ₆ , δ , м.д., J/Гц): 12.54 (1H, уш. с, 5-OH-группа), 10.18 (1H, уш. с, 4'-OH-группа), 7.75 (2H, д, J = 9.0, H-2' и H-6'), 6.88 (2H, д, J = 9.0, H-3' и H-5'), 6.74 (1H, д, J = 2.5, H-8), 6.42 (1H, д, J = 2.5,

		<p>H-6), 5.51 (1H, д, 1.0 Гц, H-1''' равнозны), 5.21 (1H, д, 1.0 Гц, H-1'' равнозны), 3.0-5.1 (м, 8H равнозны), 1.09 (3H, д, 6 Гц, CH₃ равнозны при 7-OH), 0.76 (3H, д, 6 Гц, CH₃ равнозны при 3-OH).</p> <p>Спектр ЯМР ¹³C (100.52 МГц, DMSO-d₆, δ_c, м.д.): 176.65 (C-4), 159.93 (C-7), 156.89 (C-5), 151.95 (C-9), 148.44 (C-2), 145.59 (C-4'), 136.28 (C-3), 132.32 (C-6), 130.18 (C-2' и C-6'), 122.39 (C-1'), 115.98 (C-3' и C-5'), 106.31 (C-10), 102.39 (C-1''' равнозны при 7-OH), 99.98 (C-1'' равнозны при 3-OH), 98.93 (C-6), 95.12 (C-8), 72.10 (C-4''), 71.62 (C-5''), 71.20 (C-4'''), 70.84 (C-2'' и C-2'''), 70.62 (C-3'' и C-3'''), 70.34 (C-5'''), 18.44 (C-6''' равнозны), 18.00 (C-6'' равнозны при 3-OH).</p> <p>HR-ESI-MS, 180 °C, <i>m/z</i>: 579.1708 [M+H]⁺, 601.1528 [M+Na]⁺, 617.1267 [M+K]⁺.</p>
8.	<p>3-O-β-D-ксилопиранозид-7-O-α-L-рамнопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидроксифлавона</p>	<p>Аморфное вещество светло-желтого цвета состава C₂₆H₂₈O₁₄. УФ-спектр (EtOH, λ_{max}, нм): 269, 372 нм; +NaOAc 270, 372; +NaOAc + H₃BO₃ 274, 372; +AlCl₃ 278, 426; +AlCl₃ + HCl 278, 426; + NaOMe 284, 425.</p> <p>Спектр ЯМР ¹H (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12.56 (1H, уш. с, 5-OH-группа), 10.20 (1H, уш. с, 4'-OH-группа), 8.09 (2H, д, J = 9.0, H-2' и J = H-6'), 6.85 (2H, д, J = 9.0, H-3' и H-5'), 6.79 (1H, д, J = 2.5, H-8), 6.41 (1H, д, J = 2.5, H-6), 5.52 (1H, д, 1.0 Гц, H-1''' равнопиранозы при 7-OH), 5.25 (1H, д, J = 7.0, H-1'' ксилопиранозы), 3.0-5.0 (9H, м, 4H равнозны и 5H ксилозы), 1.08 (3H, д, 6 Гц, CH₃ равнозны при 7-OH).</p> <p>HR-ESI-MS, 180 °C, <i>m/z</i>: 565.1552 [M+H]⁺, 687.1371 [M+Na]⁺, 603.1111 [M+K]⁺.</p>

9.	<p>3-O-β-D-ксилопиранозид-7-O-α-L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона</p>	<p>Аморфное вещество желтого цвета состава C₂₆H₂₈O₁₅. УФ-спектр (EtOH, λ_{max}, нм): 257, 268пл, 361 нм; + NaOAc 258, 375 нм; + NaOAc + H₃BO₃ 260, 378 нм; + AlCl₃ 274, 415 нм; + AlCl₃ + HCl 270, 404 нм.</p> <p>¹H-ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12.56 (1H, уш. с, 5-OH-группа), 9.41 (2H, уш. с, 3'-OH-группа и 4'-OH-группа), 7.64 (1H, д, J = 2.5 Гц, H-2'), 7.60 (1H, дд, J = 2.5 и 9 Гц, H-6'), 6.85 (1H, д, J = 9, H-5'), 6.78 (1H, д, 2.5 Гц, H-8), 6.40 (1H, д, 2.5 Гц, H-6), 5.22 (1H, д, 1.0 Гц, H-1''') рамнопиранозы при 7-OH), 5.32 (1H, д, J = 7.0, H-1'' ксилопиранозы), 3.0-4.0 (9H, м, 4H рамнозы и 5H ксилозы), 1.07 (3H, д, 6 Гц, CH₃ рамнозы).</p> <p>HR-ESI-MS, 180 °C, m/z: 581.1501 [M+H]⁺, 603.1320 [M+Na]⁺, 617.1060 [M+K]⁺</p>
10.	<p>Кемпферол (3,5,7,4'-тетрагидроксифлавон)</p> 	<p>Светло-желтое кристаллическое вещество состава C₁₅H₁₀O₆ с т.пл. 284-286 °C (водный спирт). УФ-спектр (EtOH, λ_{max}, нм): 269, 372; +NaOAc 278, 379 +NaOAc + H₃BO₃ 278, 380; +AlCl₃ 278, 430; +AlCl₃ + HCl 278, 430; + NaOMe 285, 427.</p> <p>Спектр ЯМР ¹H (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12.45 (1H, с, 5-OH-группа), 10.76 (1H, с, 7-OH-группа), 10.08 (1H, с, 4'-OH-группа), 9.32 (1H, с, 3-OH-группа), 8.00 (2H, д, J = 9.0, H-2' и H-6'), 6.87 (2H, д, J = 9.0, H-3' и H-5'), 6.40 ((1H, д, J = 2.5, H-8), 6.14 (1H, д, J = 2.5, H-6).</p>

11.	<p style="text-align: center;">Кверцетин (3,5,7,3',4'- пентагидроксифлавои)</p> 	<p>Ярко-желтое кристаллическое вещество состава $C_{15}H_{10}O_7$ с т.пл. 310-312 °С. УФ-спектр (EtOH, λ_{max}, нм): 257, 268 пл, 375; + NaOAc 274, 380; +NaOAc + H_3BO_3 274, 398; +$AlCl_3$ 270, 430; +$AlCl_3$ + HCl 270, 410.</p> <p>Спектр ЯМР 1H (399.78 МГц, DMSO-d_6, δ, м.д., J/Гц): 12.45 (1H, с, 5-OH), 10.72 (1H, с, 7-OH-группа), 9.54 (1H, с, 4'-OH-группа), 9.32 (1H, с, 3'-OH-группа), 9.26 (1H, с, 3-OH-группа), 7.64 (1H, д, J = 2.5, H-2'), 7.51 (дд, J = 2.5 и J = 9.0, H-6'), 6,83 (1H, д, J = 9.0, H-5'), 6.37 (1H, д, J = 2.5, H-8), 6.15 (1H, д, J = 2.5, H-6).</p>
12.	<p style="text-align: center;">Кверцитрин (3-O-α-L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'- пентагидроксифлавои)</p>	<p>Светло-желтое кристаллическое вещество состава $C_{21}H_{20}O_{12}$ с т.пл. 186-188 °С (водный спирт). λ_{max} EtOH 257, 268пл, 362 нм; + NaOAc 273, 381 нм; + NaOAc + H_3BO_3 262, 379 нм; + $AlCl_3$ 274, 414 нм; + $AlCl_3$ + HCl 270, 405 нм.</p> <p>1H-ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO-d_6, δ, м.д., J/Гц): 12.59 (1H, с, 5-OH-группа), 9.41 (3H, уш. с, 7-OH-группа, 4'-OH-группа и 3'-OH-группа), 7.30 (1H, д, J = 2.5 Гц, H-2'), 7.25 (1H, дд, J = 2.5, 9 Гц, H-6'), 6.78 (1H, д, J = 9, H-5'), 6.36 (1H, д, 2.5 Гц, H-8), 6.16 (1H, д, 2.5 Гц, H-6), 5.22 (1H, д, 1.5 Гц, H-1'' рамнозы), 2.8-5.0 (м, 4H рамнозы), 0.78 (3H, д, 6 Гц, CH_3 рамнозы).</p> <p>^{13}C-ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO-d_6, δ_c, м.д.): 177.98 (C-4), 164.64 (C-7), 161.76 (C-5), 156.90 (C-9), 156.78 (C-2), 148.96 (C-4'), 147.41 (C-3'), 134.74 (C-3), 121.63 (C-1'), 121.43 (C-2'), 116.16 (C-6'), 115.63 (C-5'), 104.54 (C-10), 102.35 (C-1'' рамнозы), 99.21 (C-6), 94.17 (C-8), 71.69 (C-3''), 71.11 (C-5''), 70.58 (C-4''), 70.42 (C-2''), 18.03 (C-6'' рамнозы).</p>

		Масс-спектр кверцитрина (HR-ESI-MS, 180 °C, m/z): m/z 449.1083.
13.	7-O-α-L-рамнопиранозид 3,5,7,3',4'- пентагидроксифлавона	Светло-желтое кристаллическое вещество состава $C_{21}H_{20}O_{12}$ с т.пл. 186-188 °C (водный спирт). λ_{max} EtOH 257, 268пл, 362 нм; + NaOAc 259, 381 нм; + NaOAc + H_3BO_3 259, 380 нм; + $AlCl_3$ 274, 414 нм; + $AlCl_3$ + HCl 270, 405 нм. 1H -ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12.59 (1H, с, 5-OH-группа), 7.30 (1H, д, J = 2.5 Гц, H-2'), 7.25 (1H, дд, J = 2.5, 9 Гц, H-6'), 6.78 (1H, д, J = 9, H-5'), 6.36 (1H, д, 2.5 Гц, H-8), 6.16 (1H, д, 2.5 Гц, H-6), 5.22 (1H, д, 1.5 Гц, H-1'' рамнозы), 2.8-5.0 (м, 4H рамнозы), 1.08 (3H, д, 6 Гц, CH_3 рамнозы). Масс-спектр (HR-ESI-MS, 180 °C, m/z): m/z 449.1078.
14.	Изокверцитрин (3-O-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,3¹,4¹- пентагидроксифлавона)	Светло-желтое кристаллическое вещество состава $C_{21}H_{20}O_{12}$ с т.пл. 223-225 °C (водный спирт). λ_{max} EtOH 256, 267 пл, 361 нм; + NaOAc 273, 380 нм; + NaOAc + H_3BO_3 262, 378 нм; + $AlCl_3$ 274, 415 нм; + $AlCl_3$ + HCl 270, 404 нм. 1H -ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO- d_6 , δ , м.д., J/Гц): 12,60 (1H, с, 5-OH-группа), 7,68 (1H, дд, 2,5 и 9 Гц, H-6'), 7,52 (д, 2,5 Гц, H-2 ¹), 6,86 (1H, д, 9 Гц, H-5 ¹), 6,40 (1H, д, 2,5 Гц, H-8), 6,18 (1H, д, 2,5 Гц, H-6), 5,32 (д, 7 Гц, H-1 ¹¹ глюкозы), 3,0-5,0 (м, 6H глюкозы). HR-ESI-MS, 180 °C, m/z : 465.1028 [M+H] ⁺ , 487.0847 [M+Na] ⁺ , 503.0586 [M+K] ⁺ .
15.	Патулетин (3,5,7,3',4'-пентагидрокси-6- метоксифлавонон)	Кристаллическое вещество ярко желтого цвета состава $C_{16}H_{12}O_8$; т.пл. 265-267 °C (водный спирт). УФ-спектр: λ_{max}^{EtOH} 264, 296пл., 378 нм; +NaOAc 268, 382 +NaOAc + H_3BO_3 270, 396;

		<p>+AlCl₃ 274, 381пл., 438 нм; +AlCl₃ + HCl 275, 381пл., 436 нм; + NaOMe 328, 368пл., 428(пл.) нм.</p> <p>¹H-ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12.54 (1H, с, 5-OH-группа), 10.65 (1H, с, 7-OH-группа), 9.56 (1H, с, 4'-OH-группа), 9.32 (1H, с, 3-OH-группа), 7.64 (1H, д, 2.5 Гц, H-2'), 7.50 (1H, дд, 2.5 и 8.5 Гц, H-6'), 6.85 (1H, д, 8.5 Гц, H-5'), 6.48 (1H, с, H-8), 3,73 (3H, с, OCH₃ при C-6).</p> <p>¹³C-ЯМР спектр (100.52 МГц, ДМСО-d₆, δ_с, м.д.): 176.56 (C-4), 157.50 (C-7), 152.27 (C-5), 151.84 (C-9), 148.24 (C-4'), 147.46 (C-3'), 145.49 (C-3), 135.31 (C-6'), 132.32 (C-2'), 122.39 (C-1'), 120.56 (C-6), 116.08 (C-2), 115.93 (C-5'), 104.12 (C-10), 60.52 (CH₃O при C-6).</p> <p>HR-ESI-MS, 180 °C, <i>m/z</i>: 333.0605 [M+H]⁺, 355.0424 [M+Na]⁺, 371.0164 [M+K]⁺.</p>
16.	<p>3-O-β-D-глюкопиранозид лупеола</p>	<p>Игольчатые кристаллы серовато-белого цвета состава C₃₆H₆₀O₆ с т.пл. 195-197 °C (хлороформ-этанол).</p> <p>¹H-ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 4.82 (2H, м, 2H-20), 4.18 (1H, д, J = 7.0, H-1' глюкопиранозы), 3.38 (1H, м, 3-OH-группа), 2.8-3.6 (6H глюкопиранозы), 1.90 (2H, м, 2H-15), 1.89 (1H, м, H-22), 1.58 (3H, м, CH₃-27), 0.92 (6H, с, CH₃-28 и CH₃-30), 0.78 (3H, с, CH₃-23), 0.76 (6H, с, CH₃-24 и CH₃-26), 0.73 (3H, с, CH₃-25), 0.61 (1H, м, H-5).</p> <p>¹³C-ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO-d₆, δ_с, м.д.): 140.98 (C-13), 121.72 (C-29), 101.32 (C-1' глюкозы) 77.42 (C-3 и C-5'' глюкозы), 77,29 (C-3' глюкозы), 74.00 (C-2' глюкозы), 70.62 (C-4' глюкозы), 61.62 (C-6' глюкозы), 55.88 (C-5),</p>

		51.12 (C-9), 50.14 (C-18 и C-19), 42.38 (C-8, C-14 и C-17), 42.27 (C-22), 38.84 (C-1, C-4 и C-13), 37.37 (C-10), 36.76 (C-16), 31.94 (C-7, C-17 и C-21), 31.87 (C-7), 29.77 (C-21), 29.23 (C-2, C-15, C-23, C-28), 21.64 (C-11), 19.63 (C-6), 19.47 (C-30), 19.38 (C-26), 12.21 (C-25, C-27), 12.06 (C-24).
17.	<p>3-O-β-D-глюкопиранозид β-амирина</p>	<p>Игольчатые кристаллы серовато-белого цвета состава C₃₆H₆₀O₆ с т.пл. 195-197 °C (хлороформ-этанол).</p> <p>¹H-ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 5.10 (1H, м, H-12), 4.18 (1H, д, J = 7.0, H-1'' глюкопиранозы), 2.8-3.6 (6H глюкопиранозы), 3.02 (1H, м, 3-OH-группа), 1.90 (2H, м, 2H-15), 1.89 (1H, м, H-22), 0.92 (6H, с, CH₃-27 и CH₃-28), 0.87 (3H, с, CH₃-23), 0.86 (6H, с, CH₃-24 и CH₃-26), 0.83 (3H, с, CH₃-29), 0.76 (3H, с, CH₃-25), 0.73 (3H, с, CH₃-30), 0.66 (1H, м, H-5).</p> <p>¹³C-ЯМР спектр (100.52 МГц, DMSO-d₆, δ_c, м.д.): 140.98 (C-13), 121.72 (C-12), 101.32 (C-1' глюкозы) 77.42 (C-3 и C-5'' глюкозы), 77,29 (C-3' глюкозы), 74.00 (C-2' глюкозы), 70.62 (C-4' глюкозы), 61.62 (C-6' глюкозы), 55.88 (C-5), 50.14 (C-9), 42.30 (C-14), 42.27 (C-8 и C-22), 37.37 (C-4 и C-19), 36.76 (C-10), 31.94 (C-17), 31.87 (C-7), 29.77 (C-21), 29.23 (C-2, C-15, C-23, C-28), 25.40 (C-16), 24.41 (C-11), 23.12 (C-27 и C-30), 19.63 (C-6), 19.47 (C-29), 19.38 (C-26), 12.65 (C-25), 12.38 (C-24).</p> <p>Масс-спектр (HR-ESI-MS, 180 °C, m/z): m/z 589.3855 [M+H]⁺, m/z 611.3769 [M+Na]⁺, m/z 627.3769 [M+K]⁺.</p>

Флавоноидный состав соцветий и оставшейся после их сбора надземной части значительно отличаются друг от друга. Доминирующими флавоноидами в траве бархатцев отклоненных являются дигликозиды кемпферола и кверцетина, среди которых преобладает 3,7-ди- α -L-рамнопиранозид кемпферола (табл. 7).

Общими флавоноидными компонентами соцветий и надземной части бархатцев отклонённых являются кверцетин и патулетин.

Впервые из травы изучаемого вида растения выделены сапонины, в виде смеси 3-O- β -D-глюкопиранозид лупеола и 3-O- β -D-глюкопиранозид β -амирина. В отличие от травы, соцветия содержат эти вещества содержатся в виде агликона.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Из соцветий бархатцев отклоненных выделены 6 индивидуальных соединений, относящиеся к флавоноидами (№1-5 Таблицы 6) и сапониам (№6 Таблицы 6). Структура соединений была установлена методами УФ-, ¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР-спектроскопией, масс-спектрометрией.
2. Доминирующими флавоноидами соцветий бархатцев отклоненных являются патулитрин и его агликон – патулетин. Определены спектральные этих соединений.
3. Впервые для вида *Tagetes patula* L. были выделены сапонины, в частности, β-амирин.
4. В минорных количествах выделены и идентифицированы флавоноиды 6-метоксикемпферол (3,4',5,7-тетрагидрокси-6-метоксифлавоон) и 7-О-гликозид-6-метоксикемпферола (7-О-гликозид 3,4',5,7-тетрагидрокси-6-метоксифлавоона), не описанные ранее для соцветий изучаемого нами вида, а также кверцетин, описанный ранее для цветков бархатцев отклонённых.
5. Выделены доминирующие флавоноиды травы бархатцев отклонённых. В данном виде сырья флавоноиды встречаются преимущественно в виде гликозидов.
6. В результате определения спектральных характеристик выделенных веществ и проведения гидролиза было установлено, что флавоноидный состав травы бархатцев отклоненных представлен дигликозидами кемпферола и кверцетина, среди которых преобладает 3,7-ди-α-L-рамнопиранозид кемпферола.
7. Общими флавоноидами соцветий и травы бархатцев отклоненных являются кверцетин и патулетин.
8. Впервые из надземной части выделены сапонины, представляющие собой смесь 3-О-β-D-глюкопиранозида лупеола и 3-О-β-D-глюкопиранозида β-амирина, в отличие от соцветий, в которых эти вещества содержатся в форме агликона.

ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ СЫРЬЯ БАРХАТЦЕВ ОТКЛОНЕННЫХ

Немаловажным аспектом разработки нового вида лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов на его основе является подготовка нормативной документации, регламентирующей их качество.

5.1. Качественный анализ соцветий *Tagetes patula* L. методом ТСХ

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 вещества, выделенные из соцветий бархатцев отклоненных, а также кверцетин, описанный ранее для данного вида сырья.

Для выбора оптимальных условий анализа нами были проведены опыты в нескольких хроматографических системах растворителей (рис. 14). Наиболее информативными были результаты, полученные с помощью системы растворителей хлороформ – этанол 96 % – вода (25:18:2) (рис. 14).

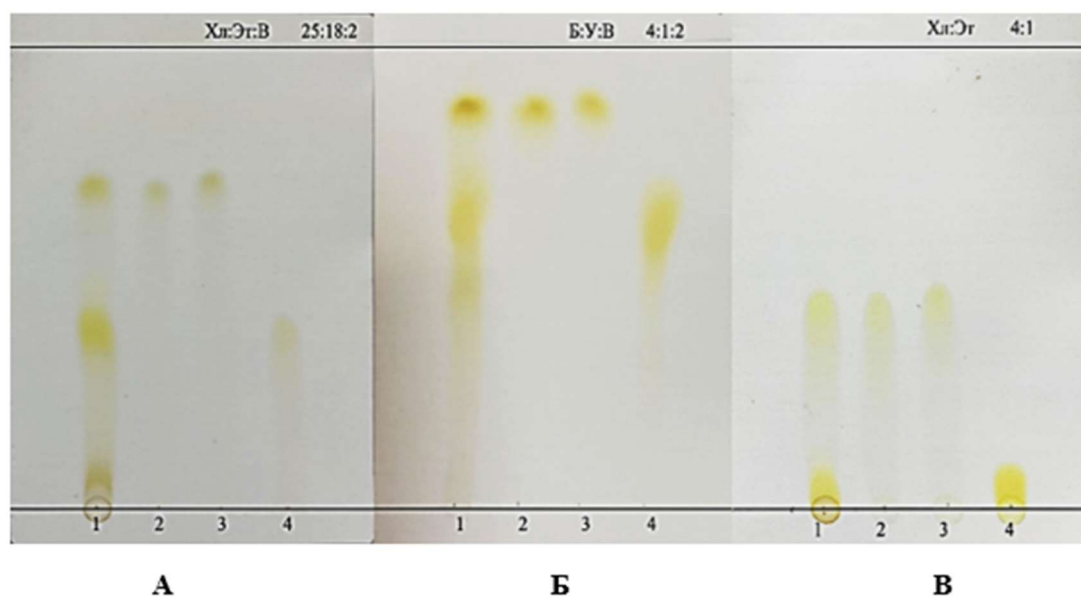


Рисунок 14 – Хроматограмма водно-спиртового извлечения из соцветий бархатцев отклоненных: А – в системе растворителей хлороформ – этанол 96% – вода (25:18:2), Б – в системе растворителей *n*-бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2), В – в системе растворителей хлороформ – этанол (4:1).

Обозначения: 1 – водно-спиртовое извлечение из соцветий; 2 – патулетин; 3 – кверцетин; 4 – патулитрин.

Поскольку доминирующими и диагностически значимыми БАС в соцветиях бархатцев отклоненных являются флавоноиды, нами были выбраны следующие виды детектирования: обработка 3% спиртовым раствором алюминия хлорида, просматривание в УФ-свете при длинах волн 254 и 365 нм до и после обработки реактивом (рис. 15).

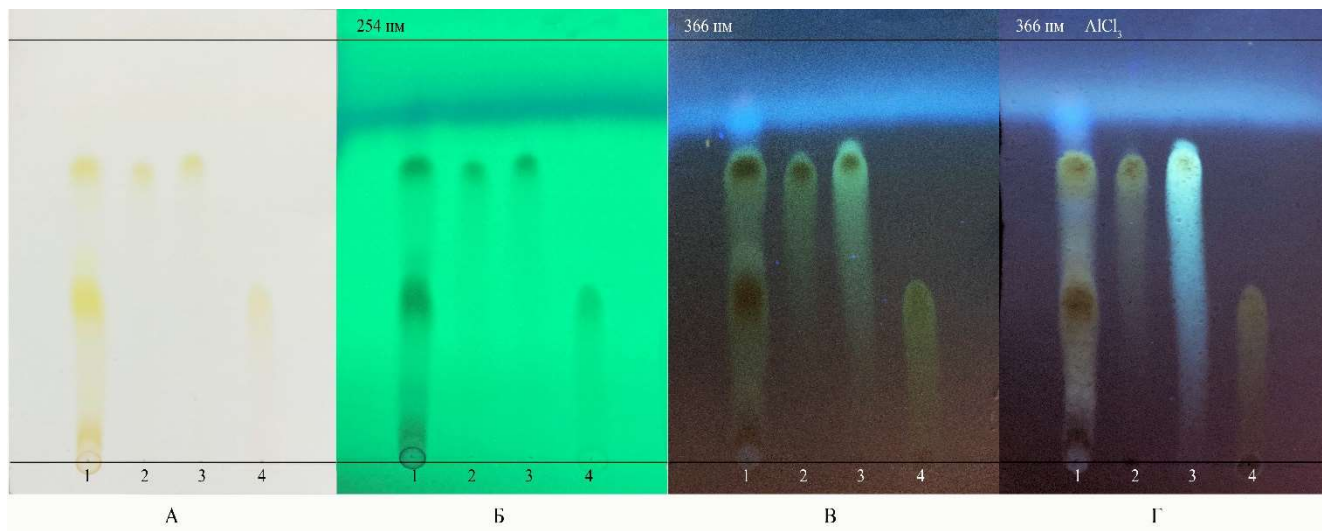


Рисунок 15 – Хроматограмма водно-спиртового извлечения из соцветий бархатцев отклоненных в системе растворителей хлороформ–этанол–вода (25:18:2): А – до проявления, Б – детекция в УФ - свете при длине волны 254 нм, В – детекция в УФ - свете при длине волны 365 нм, Г – детекция в УФ - свете при длине волны 365 нм после обработки спиртовым раствором $AlCl_3$.

Обозначения: 1 – водно-спиртовое извлечение из соцветий бархатцев отклоненных; 2 – патулетин; 3 – кверцетин; 4 – патулитрин.

Наиболее эффективного разделения удалось достичь в системе растворителей: хлороформ – этанол 96% – вода (25:18:2). Детектирование веществ при длине волны 366 нм до и после обработки спиртовым раствором $AlCl_3$ казалось наиболее информативным (рис. 14 и 15).

Нами были проанализированы водно-спиртовые извлечения из соцветий бархатцев отклоненных семи различных сортов. Методом ТСХ в присутствии растворов стандартных образцов подтверждено наличие патулетина и патулитрина в извлечениях из всех образцов изучаемых сортов (рис. 16).

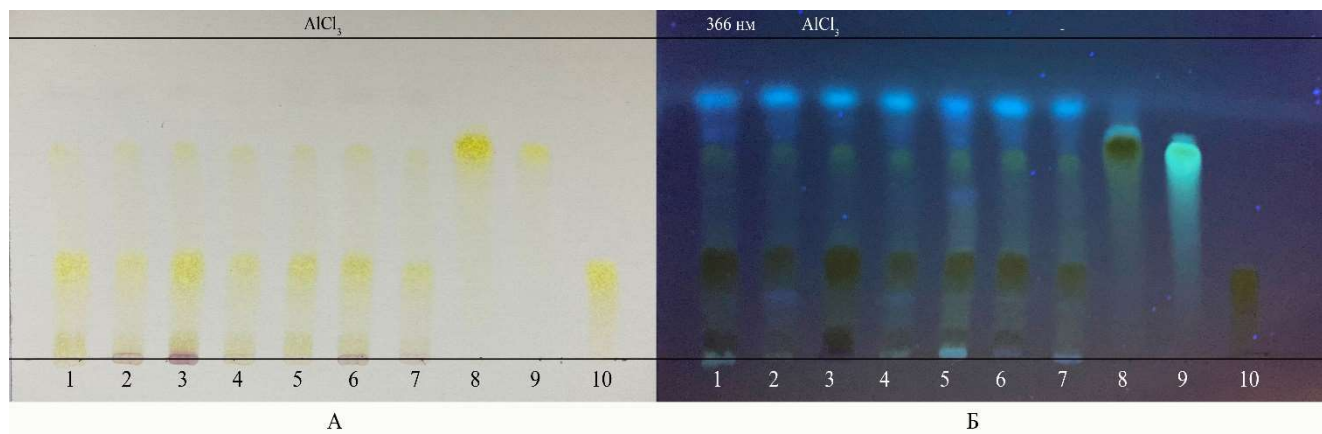


Рисунок 16 – Хроматограмма водно-спиртовых извлечений из соцветий бархатцев отклоненных различных сортов в системе растворителей хлороформ– этанол–вода (25:18:2): А – при проявлении спиртовым раствором алюминия хлорида, Б – детекция в УФ - свете при длине волны 366 нм после обработки спиртовым раствором AlCl_3 .

Обозначения: 1 – сорт «Мандарин»; 2 – сорт «Красный герой»; 3 – сорт «Скарлет София»; 4 – сорт «Оранжевый чемпион»; 5 – сорт «Малыш Гармония»; 6 – сорт «Красная парча»; 7 – сорт «Оранжевое пламя»; 8 – патулетин; 9 – кверцетин; 10 – патулитрин.

Было отмечено, 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 изменения её окраски с желтой на ярко-зеленую) (рис. 15 и 16). Тем не менее, ввиду отсутствия стандартного образца (СО) патулетина, кверцетин может выступать в роли вещества «свидетеля».

Методика проведения ТСХ анализа: около 1,0 сырья, измельченного до величины частиц 3 мм, помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 10 мл этилового спирта 70%, нагревают с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 30 минут. После охлаждения до комнатной температуры раствор фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

Около 0,005 г патулетина растворяют в 10 мл спирта 96% и перемешивают (раствор стандартного образца (СО) патулетина).

Около 0,005 г патулитрина растворяют в 10 мл спирта 96% и перемешивают (раствор стандартного образца (СО) патулитрина).

На линию старта аналитической хроматографической пластики со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемого раствора и параллельно 5 мкл растворов образцов сравнения патулетина и патулитрина. 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 96% – 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 366 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: зона адсорбции с желтой или коричнево-желтой флуоресценцией на уровне адсорбции СО патулетина со значением R_f около 0,7, зона адсорбции с желтой или коричнево-желтой флуоресценцией со значением R_f около 0,4 на уровне адсорбции СО патулитрина.

5.2. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных методом дифференциальной спектрофотометрии

С целью разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных были изучены УФ-спектры растворов водно-спиртовых извлечений из данного сырья, а также растворов выделенных флавоноидов (патулетина и патулитрина) и кверцетина, описанного для цветков бархатцев отклоненных.

Сравнительное исследование УФ-спектров растворов флавоноидов показало, что их спектры имеют близкие характеристики, как в случае исходных растворов

(рис. 17), так и в присутствии алюминия хлорида (рис. 18). Следовательно, все три флавоноида потенциально могут быть использованы в качестве стандартных образцов, так как имеют сопоставимые спектральные характеристики с УФ-спектрами водно-спиртовых извлечений цветков бархатцев (рис. 19). Однако, принимая во внимание то обстоятельство, что патулитрин является диагностически значимым компонентом соцветий бархатцев, считаем целесообразным использование именно этого флавоноида в качестве стандартного образца в методике количественного определения суммы флавоноидов (рис. 20).

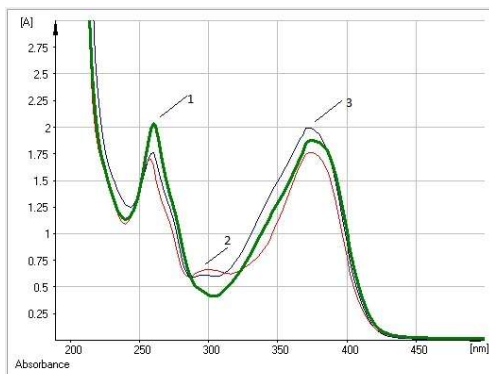


Рисунок 17 – Электронные спектры растворов флавоноидов – патулитрина (1), патулетина (3) и кверцетина (2).

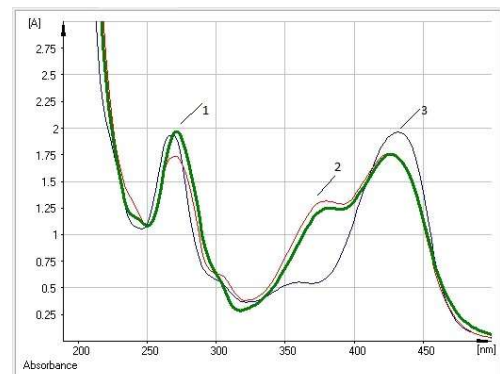


Рисунок 18 – Электронные спектры растворов флавоноидов в присутствии алюминия хлорида – патулитрина (1), патулетина (2) и кверцетина (3).

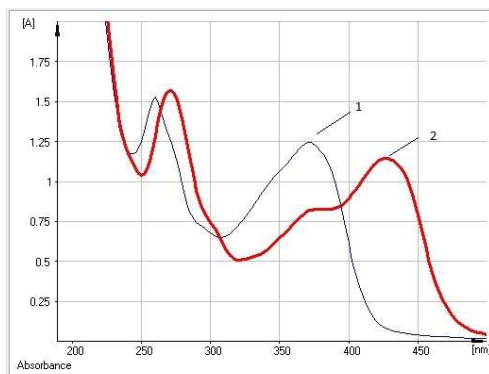


Рисунок 19 – Электронные спектры исходного раствора водно-спиртового извлечения из соцветий бархатцев отклоненных (1) и в присутствии раствора алюминия хлорида (2).

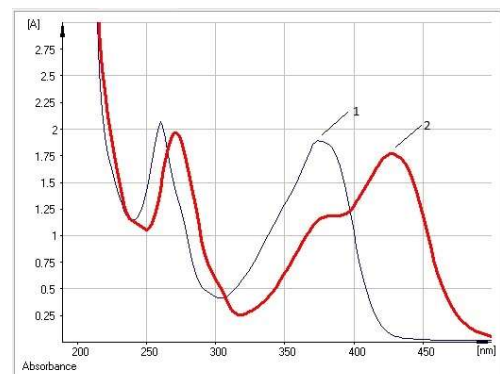


Рисунок 20 – Электронные спектры исходного раствора патулитрина (1) и раствора патулитрина в присутствии алюминия хлорида (2).

В УФ-спектрах раствора патулитрина и раствора водно-спиртового извлечения из соцветий бархатцев отклоненных обнаруживаются батохромные сдвиги длинноволновой полосы в область 426-430 нм (рис. 19 и 20).

Установлено, что патулитрин во многом определяет характер кривой поглощения водно-спиртового извлечения из цветков бархатцев отклоненных (рис. 21 и 22).

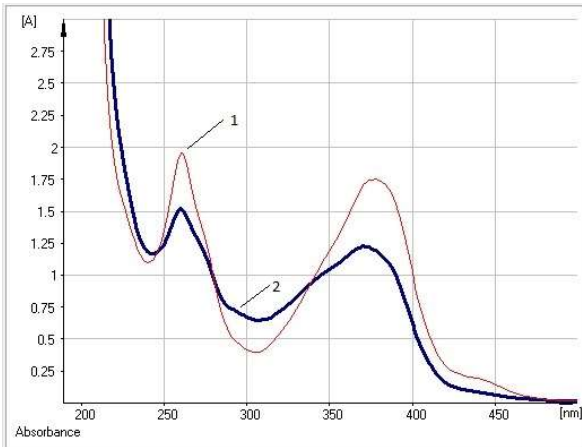


Рисунок 21 – Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения соцветий бархатцев отклоненных (1) и патулитрина (2).

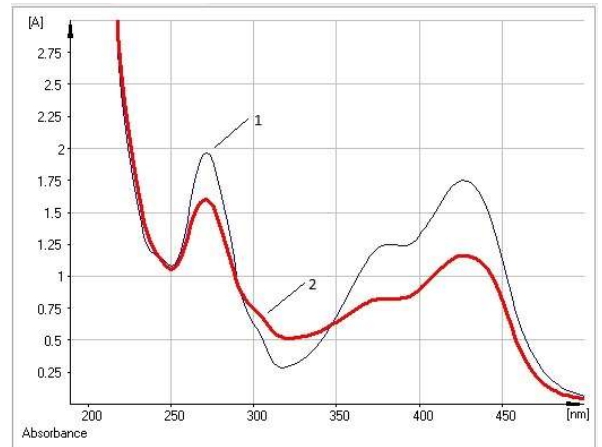


Рисунок 22 – Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения соцветий бархатцев отклоненных в присутствии алюминия хлорида (1) и электронный спектр патулитрина в присутствии алюминия хлорида (2).

В УФ-спектре водно-спиртового извлечения из цветков бархатцев отклоненных в дифференциальном варианте обнаруживается максимум поглощения в интервале длин волн $428 \text{ нм} \pm 2 \text{ нм}$ (рис. 23), который практически соответствует максимуму спиртового раствора патулитрина (дифференциальный вариант) (рис. 24).

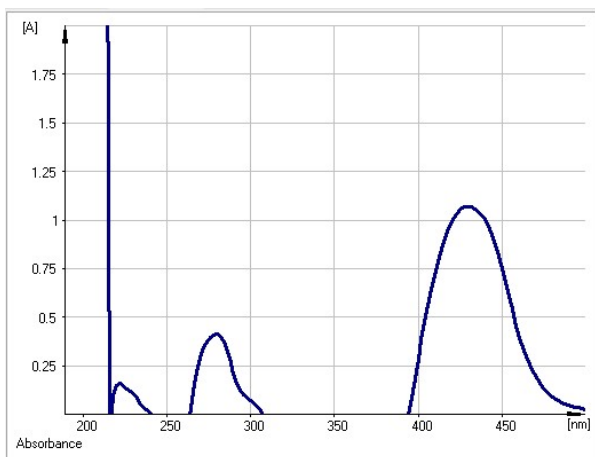


Рисунок 23 – Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения из соцветий бархатцев отклоненных в условиях дифференциальной спектрофотометрии

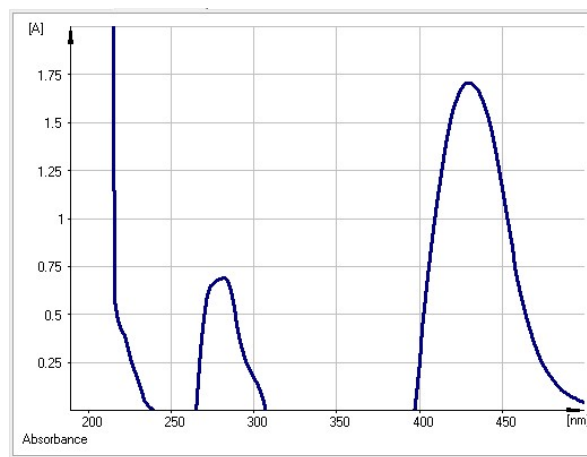


Рисунок 24 – Электронный спектр раствора патулитрина в условиях дифференциальной спектрофотометрии

Следовательно, совокупность данных УФ-спектров растворов флавоноидов, а также раствора водно-спиртового извлечения из соцветий бархатцев отклоненных позволяет рекомендовать использование в методике количественного определения суммы флавоноидов патулитрин и аналитическую длину волны 428 нм.

Далее нам был проведен ряд исследований для подбора наиболее оптимальных условий экстрагирования сырья для более точного определения суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных. Были исследованы такие параметры как концентрация этилового спирта (в %), время экстракции на кипящей водяной бане (в мин.), размер частиц сырья (в мм.), соотношение частей сырья к части экстрагента. Результаты исследования влияния различных параметров экстракции на выход действующих веществ из сырья представлен в таблице 8.

Оптимальными параметрами экстракции суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных 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 (табл. 8).

Таблица 8 – Влияние различных факторов на полноту извлечения флавоноидов из соцветий бархатцев отклоненных

Концентрация этилового спирта, %	Время экстракции, мин	Размер частиц сырья, мм	Соотношение сырье:экстрагент	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на патулитрин и абсолютно сухое сырье, %
Экстрагент				
40	60	2	1:50	5,93 ± 0,04
50	60	2	1:50	6,08 ± 0,04
60	60	2	1:50	6,69 ± 0,04
70	60	2	1:50	7,87 ± 0,05
80	60	2	1:50	7,81 ± 0,05
96	60	2	1:50	7,02 ± 0,05
Время экстрагирования				
70	30	2	1:50	6,31 ± 0,04
70	45	2	1:50	6,56 ± 0,04
70	60	2	1:50	5,35 ± 0,04
70	90	2	1:50	5,07 ± 0,04
70	120	2	1:50	4,14 ± 0,03
Размер частиц сырья				
70	45	2	1:50	8,08 ± 0,04
70	45	3	1:50	9,39 ± 0,04
70	45	5	1:50	8,80 ± 0,04
Соотношение сырье:экстрагент				
70	45	3	1:30	9,07 ± 0,05
70	45	3	1:50	9,39 ± 0,05
70	45	3	1:100	7,61 ± 0,05

В таблице 9 представлены параметры проведения стандартизации соцветий бархатцев отклоненных методом дифференциальной спектрофотометрии.

Таблица 9 – Параметры проведения количественного анализа суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных

Метод исследования	Дифференциальная спектрофотометрия
Исследуемый объект	Соцветия бархатцев отклоненных
Размер частиц сырья, мм	3
Масса навески, г	1
Экстрагент	Этиловый спирт в концентрации 70%
Соотношение «Сырье:экстрагент»	1:50
Метод экстракции	Однократная экстракция на кипящей водяной бане с присоединением обратного холодильника
Время экстрагирования, мин	45
Условия фильтрования извлечения	После охлаждения извлечения до комнатной температуры через фильтр с красной полосой
Испытуемый раствор	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
Раствор сравнения	1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 50 мл, доводят объем раствора до метки 96% этиловым спиртом
Стандартный образец	Патулитрин
Приготовление раствора СО: - навеска - объем мерной колбы	- 0,02 г. - 50 мл.

- растворитель.	- спирт этиловый 96%.
Испытуемый раствор СО	Помещают в мерную колбу на 25 мл 1 мл раствора СО патулитрина, добавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида, затем доводят объем раствора до метки 96% этиловым спиртом.
Раствор сравнения СО	1 мл полученного раствора СО патулитрина помещают в мерную колбу на 25 мл, доводят объем раствора до метки 96% этиловым спиртом
Время ожидания реакции с раствором алюминия хлорида	30 мин.
Измеряемая величина	Оптическая плотность
Длина волны, при которой наблюдаются максимумы поглощения	428 нм.

Полный текст методики описан в Приложении 4.

Содержания суммы флавоноидов рассчитывается в пересчет на абсолютно сухое сырье. 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 патулитрин 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.10).

Таблица 10 – Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных

f	$X_{\text{ср}}$	S	$P, \%$	$t(P, f)$	$\Delta X, \%$	$E, \%$
10	8,30	0,1435	95	2,23	$\pm 0,32$	$\pm 3,86$

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по показателям: специфичность, линейность, правильность и воспроизводимость. 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.

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 (опыты с добавками) (табл. 11).

Таблица 11 – Содержание суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных в зависимости от добавления патулитрина

Исходное содержание суммы флавоноидов, мг/г	Добавлено патулитрина, мг/г	Содержание суммы флавоноидов, мг/г		Ошибка	
		Расчетное	Найденное	Абсолютная, мг	Относительная, %
80,30	20,10	100,40	99,08	-1,32	-1,31
80,30	40,30	120,60	119,66	-0,94	-0,78
80,30	60,20	140,50	141,79	+1,29	+0,92

Нами было проведено сравнение флавоноидного состава соцветий семи исследуемых сортов бархатцев. Характеристики спектров поглощения для всех объектов схожи, однако они отличаются по интенсивности поглощения ввиду различий в концентрации анализируемых веществ (рис. 25-31). Кривые спектров поглощения извлечений из соцветий различных сортов бархатцев отклоненных имеют два выраженных максимума поглощения при $\lambda=260$ нм и $\lambda=370$ нм.

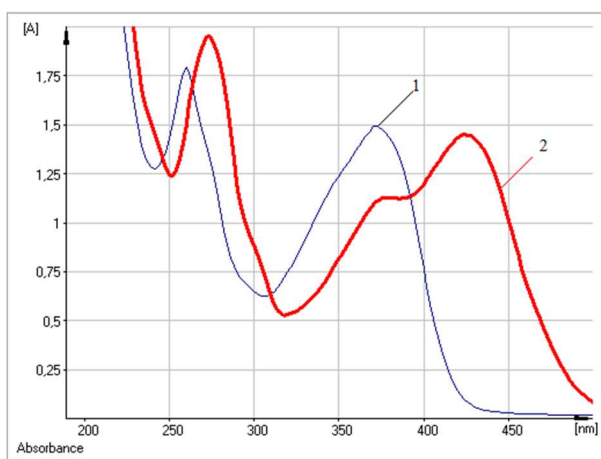


Рисунок 25 – Электронные спектры растворов водно-спиртового извлечения соцветий бархатцев отклоненных сорта «Мандарин».

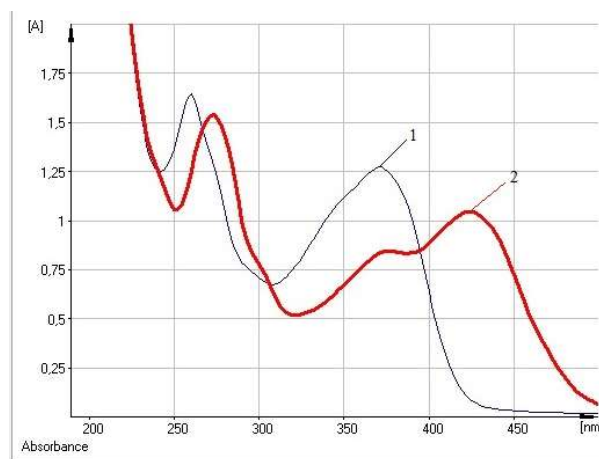


Рисунок 26 – Электронные спектры растворов водно-спиртового извлечения соцветий бархатцев отклоненных сорта «Красный герой».

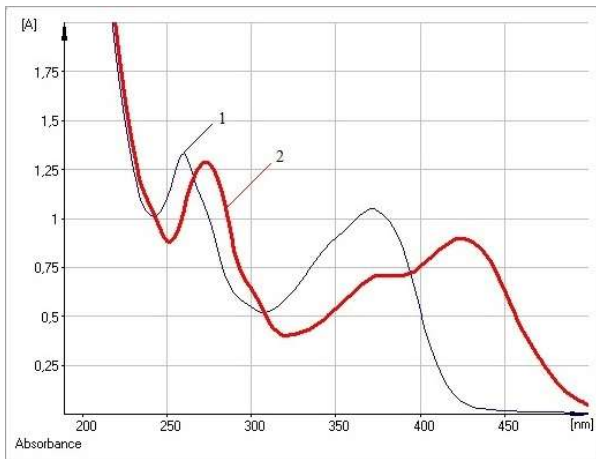


Рисунок 27 – Электронные спектры растворов водно-спиртового извлечения соцветий бархатцев отклоненных сорта «Оранжевый чемпион».

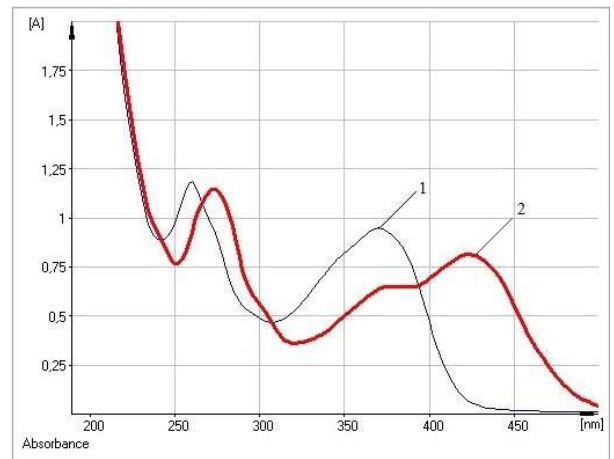


Рисунок 28 – Электронные спектры растворов водно-спиртового извлечения соцветий бархатцев отклоненных сорта «Скарлет София».

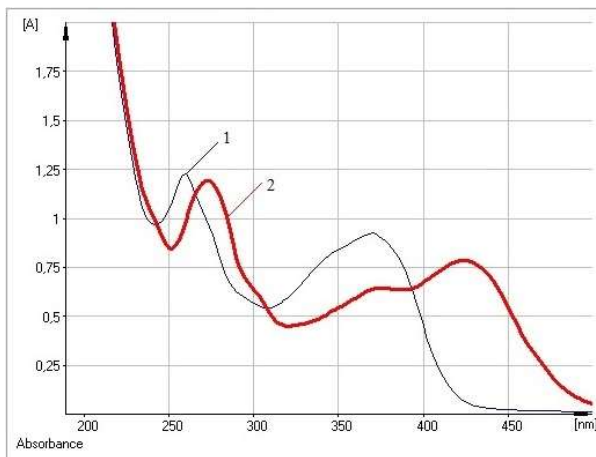


Рисунок 29 – Электронные спектры растворов водно-спиртового извлечения соцветий бархатцев отклоненных сорта «Красная парча».

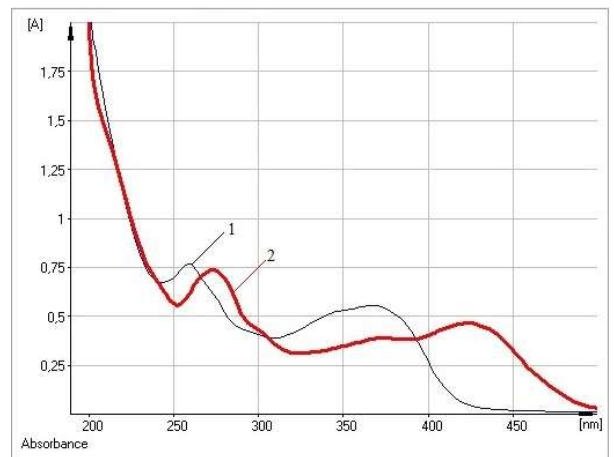


Рисунок 30 – Электронные спектры растворов водно-спиртового извлечения соцветий бархатцев отклоненных сорта «Малыш Гармония».

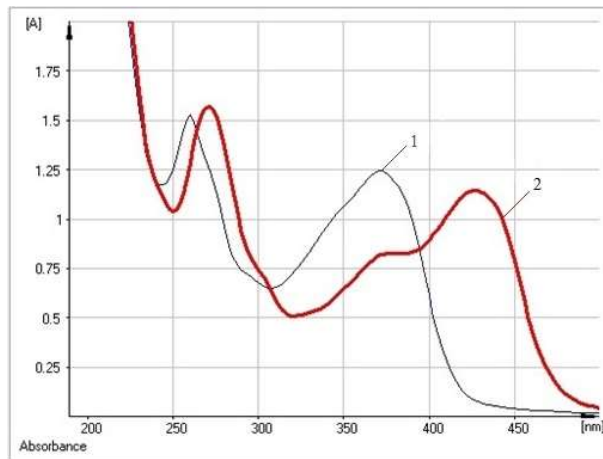


Рисунок 31 – Электронные спектры растворов водно-спиртового извлечения соцветий бархатцев отклоненных сорта «Оранжевое пламя».

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

Результаты спектрофотометрического определения количественного содержания суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных различных сортов представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Содержание суммы флавоноидов в соцветиях различных сортов бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.)

№ п/п	Сорт	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на патулитрин и абсолютно сухое сырье, %
1.	<i>T. patula</i> L. «Мандарин»	11,71 ± 0,05
2.	<i>T. patula</i> L. «Оранжевое пламя»	9,39 ± 0,03
3.	<i>T. patula</i> L. «Красный герой»	8,25 ± 0,03
4.	<i>T. patula</i> L. «Оранжевый чемпион»	7,51 ± 0,03
5.	<i>T. patula</i> L. «Скарлет София»	7,21 ± 0,03
6.	<i>T. patula</i> L. «Красная парча»	6,21 ± 0,03
7.	<i>T. patula</i> L. «Малыш Гармония»	4,36 ± 0,02

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 $4,0\%$, причем в пересчете на доминирующий и диагностически значимый флавоноид – патулитрин.

5.3. Определение содержания патулитрина в соцветиях бархатцев отклоненных методом ВЭЖХ.

Проведен предварительный ВЭЖХ-анализ компонентного состава соцветий бархатцев отклоненных. Для аналитических целей извлечения из соцветий бархатцев отклоненных получены в условиях, описанных в методике количественного определения суммы флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии (Приложение 4). Извлечение дополнительно фильтровали фильтровали через мембранный фильтр Milipore ($0,45 \text{ мкм}$) (испытуемый раствор).

Приготовление стандартного раствора патулитрина. Около $0,05 \text{ г}$ (точная навеска предварительно высушенного патулитрина (содержание основного вещества $\geq 98 \%$) переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл , растворяли в 96% этаноле и доводили объем раствора до метки тем же растворителем.

Поскольку патулитрин имеет в длинноволновой области электронного спектра максимум поглощения при $360 \pm 2 \text{ нм}$ (рис. 21), нами была выбрана данная длина волны для детекции анализируемого вещества при проведении ВЭЖХ-анализа.

Определено, что в указанных в главе 2 условиях хроматографирования при использовании системы ацетонитрил – вода в соотношении $3:7$ возможно идентифицировать анализируемый компонент – патулитрин (рис. 32 и 33).

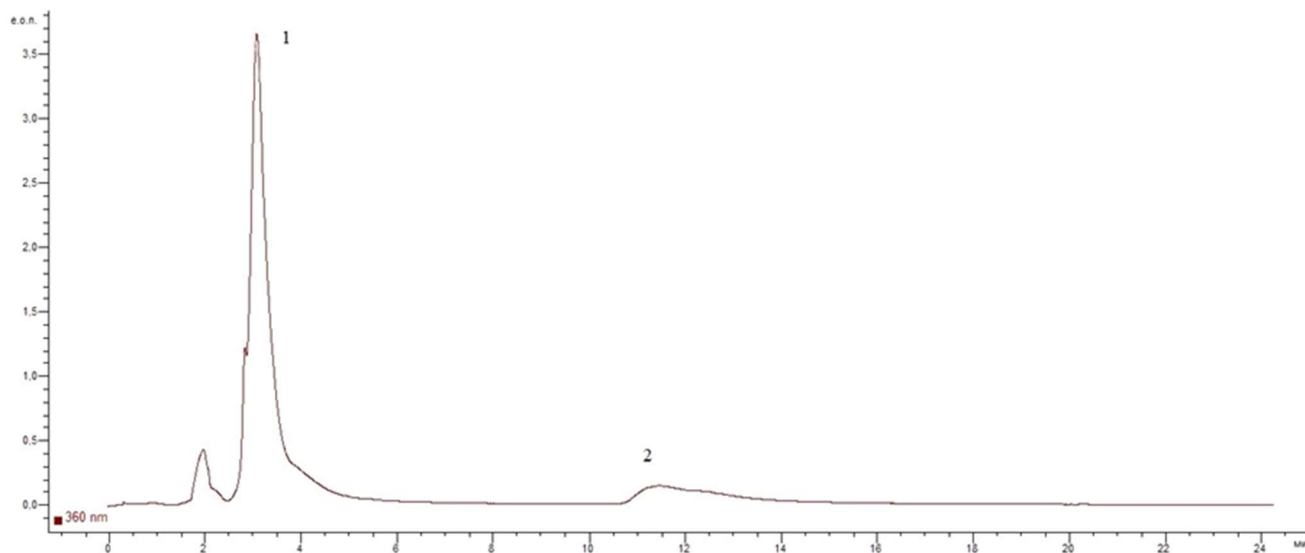


Рисунок 32 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из соцветий бархатцев отклоненных. Обозначения: 1 – патулитрин; 2 – патулетин.

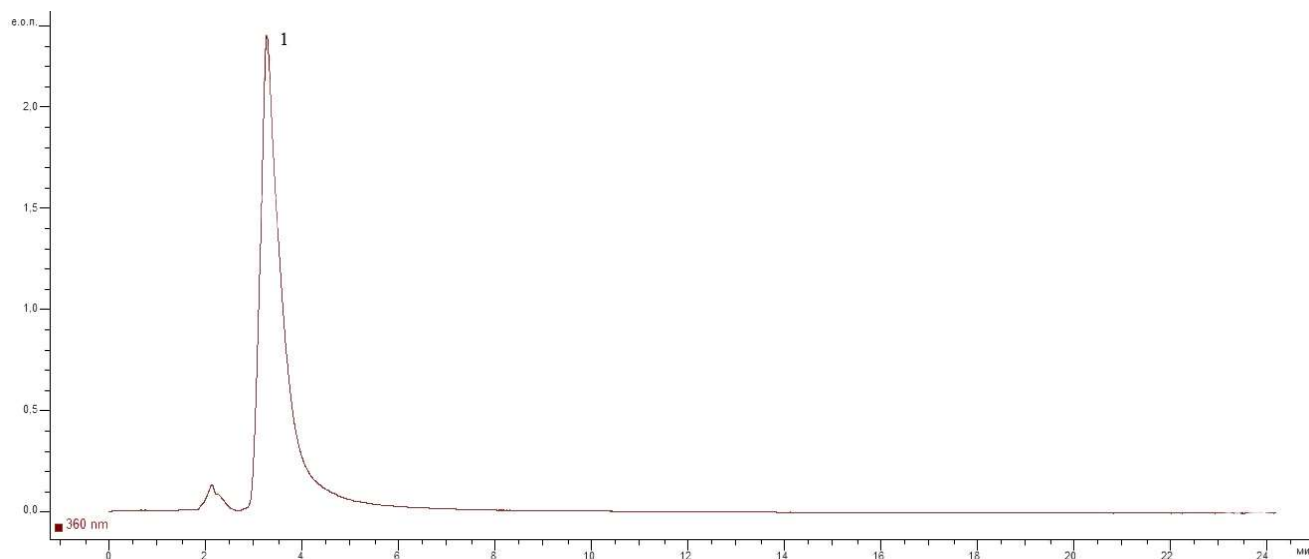


Рисунок 33 – ВЭЖХ-хроматограмма патулитрина.

Обозначения: 1 – патулитрин.

Нами были получены хроматографические профили не только патулетина и патулитрина, выделенных из соцветий бархатцев отклоненных, а также кверцетина, описанного ранее для цветков бархатцев отклоненных. Время удерживания пиков патулетина и кверцетина на хроматограммах рабочих стандартных образцов сопоставимы – 11,385 и 11,724 соответственно (рис. 34 и 35).

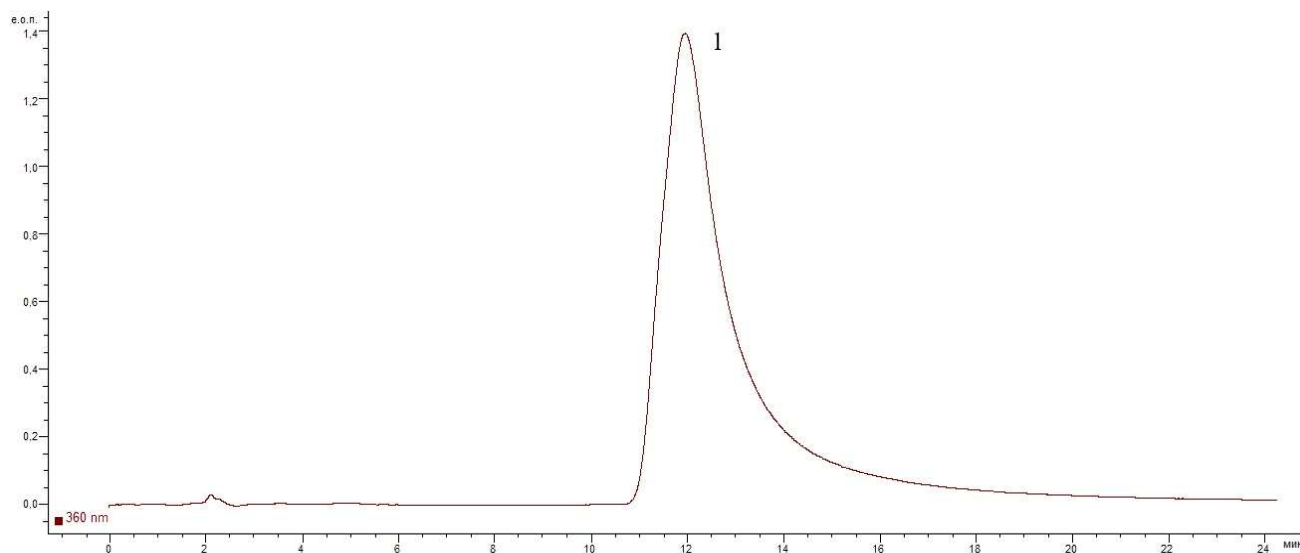


Рисунок 34 – ВЭЖХ-хроматограмма патулетина.

Обозначения: 1 – патулетин.

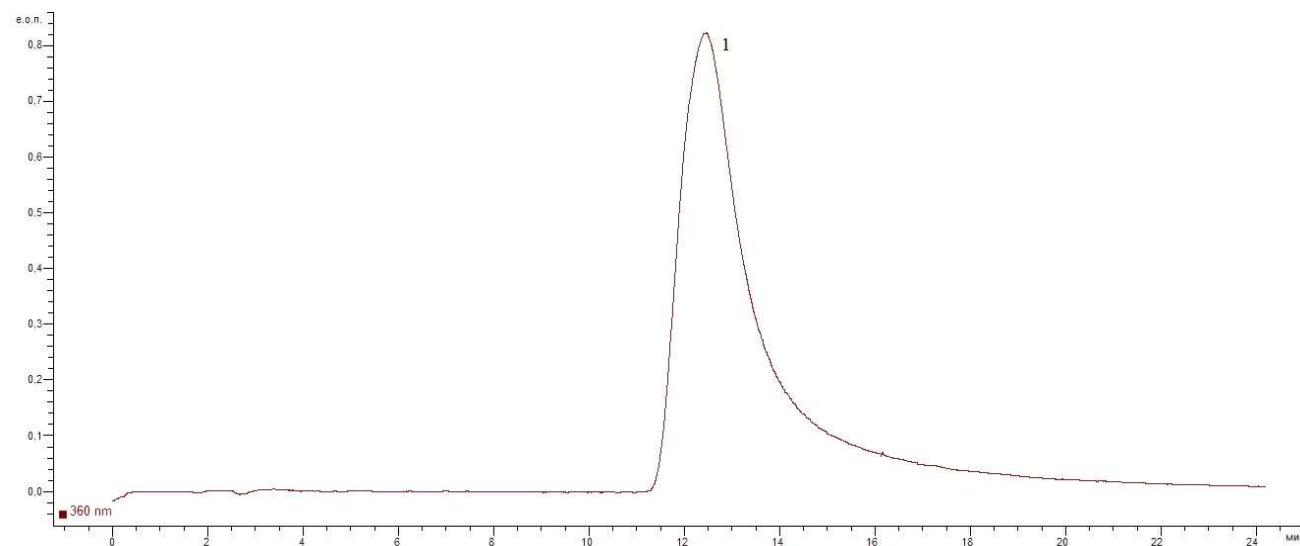


Рисунок 35 – ВЭЖХ-хроматограмма кверцетина.

Обозначения: 1 – кверцетин.

Ранее нами методами тонкослойной и колоночной хроматографией определено, что кверцетин содержится в соцветиях в минорных количествах (рис. 15), а значит в системе ацетонитрил-вода в соотношении 3:7 возможно идентифицировать именно агликон патулитрина – патулетин (рис. 32 и 34).

Время удерживания пиков веществ на хроматограммах рабочих стандартных образцов, а также в извлечении из соцветий бархатцев отклоненных представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Времена удерживания пиков флавоноидов соцветий бархатцев отклоненных.

Флавоноид	Время удерживания на хроматограмме, мин	
	Стандартный образец	Извлечение
Патулитрин	3,188	3,009
Патулетин	10,770	11,385

Добавление раствора патулитрина и патулетина в извлечение проявляется на хроматограмме увеличением интенсивности пика патулитрина и пика патулетина соответственно по сравнению с таковой флавоноидов в исходном испытуемом растворе (рис. 36 и 37).

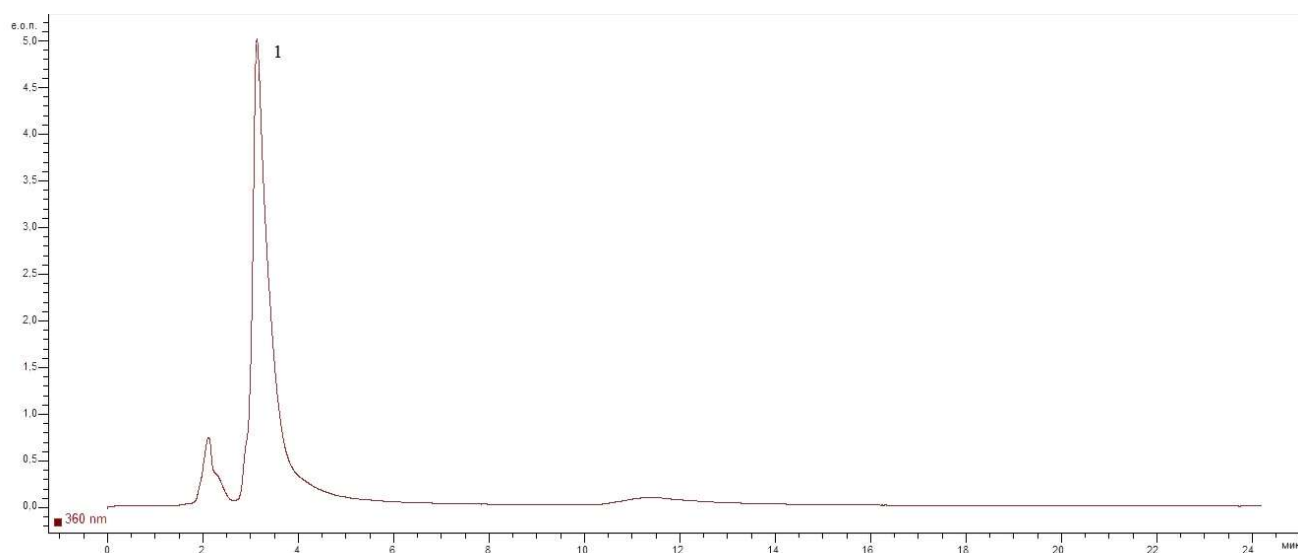


Рисунок 36 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из соцветий бархатцев отклоненных с добавлением патулитрина.

Обозначения: 1 – патулитрин.

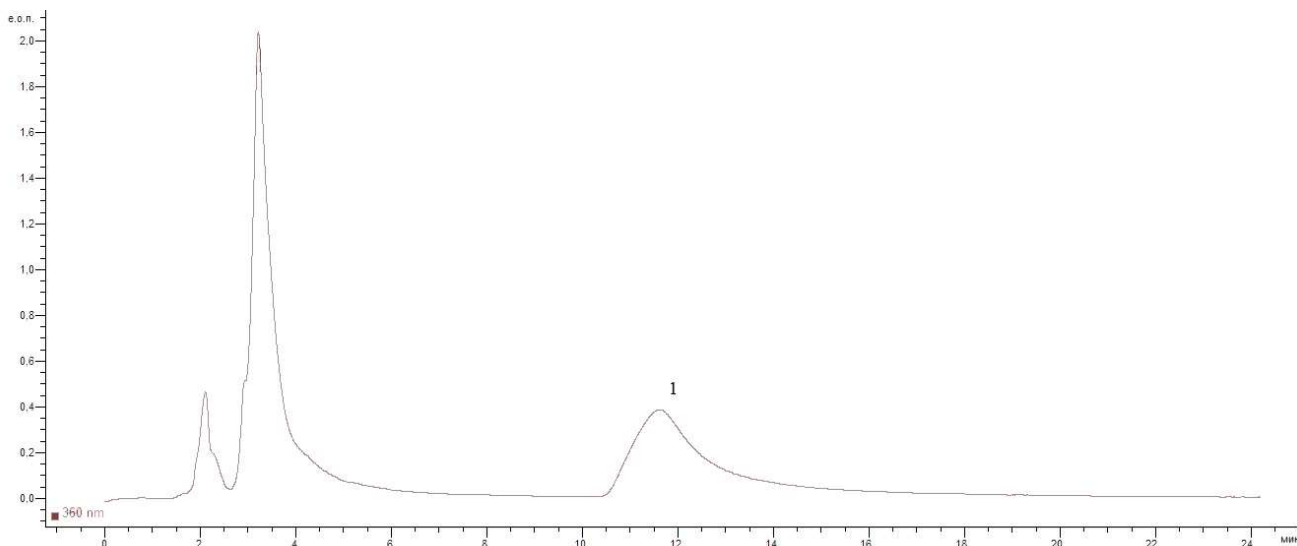


Рисунок 37 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из соцветий бархатцев отклоненных с добавлением патулетина. Обозначения: 1 – патулетин.

Таким образом методом ВЭЖХ возможно проведение качественного анализа соцветий бархатцев отклоненных, а именно определение доминирующих компонентов соцветий – патулитрина и патулетина.

С целью проверки пригодности хроматографической системы для количественного анализа флавоноидов проводили 5-кратное хроматографирование 4 мкл раствора извлечения соцветий бархатцев отклоненных. В дальнейшем рассчитывали следующие показатели: эффективность колонки, разрешение между пиками, фактор асимметрии. В результате расчетов были получены следующие результаты (табл. 14).

Таблица 14 – Определение пригодности хроматографической колонки

Параметр хроматографической колонки	Значение	Нормативный показатель
Эффективность колонки	5477	Не менее 5000 теоретических тарелок
Разрешение между пиками	3,22	Не менее 1,5
Фактор асимметрии	0,85	Не более 1,5

Полученные данные при хроматографировании позволяют оценить пригодность данной хроматографической системы, а также сделать заключение о

том, что данная система может быть использована для количественного определения патулитрина в цветках бархатцев отклоненных.

Методика количественного определения патулитрина в соцветиях бархатцев отклоненных представлена в Приложении 7.

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; S₀ – среднее значение площади пика раствора РСО патулитрина, вычисленное из хроматограмм раствора РСО патулитрина; V – объем извлечения, мл; V₁ – объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл; V₀ – объем раствора РСО патулитрина, мл; V₂ – объем вводимой пробы раствора РСО патулитрина, мкл; m – масса сырья, г; m₀ – масса РСО патулитрина, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

По результатам исследования были получены значения содержания патулитрина в исследуемых образцах (табл. 15).

Таблица 15 – Содержание патулитрина в соцветиях бархатцев отклоненных (сорт «Мандарин»)

№ п/п	Образец сырья	Содержание патулитрина, %
1.	Соцветия бархатцев отклоненных (г. Самара, Ботанический сад Самарского университета, август 2018 г.)	5,28 ±0,17
2.	Соцветия бархатцев отклоненных (г. Самара, Ботанический сад Самарского университета, сентябрь 2018 г.)	5,11±0,18
3.	Соцветия бархатцев отклоненных (г. Самара, Ботанический сад Самарского университета, август 2021 г.)	5,64 ±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 $\pm 3,32$ % (табл. 16).

Таблица 16 – Метрологические характеристики методики количественного определения патулитрина в соцветиях бархатцев отклоненных

<i>Образец</i>	<i>f</i>	<i>X_{ср}</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	$\pm 0,17$	$\pm 3,32$

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о целесообразности стандартизации соцветий бархатцев отклоненных путем определения содержания доминирующего и диагностически значимого флавоноида – патулитрина с использованием метода ВЭЖХ и детектированием на УФ-детекторе при длине волны 360 нм.

5.4. Определение содержания суммы каротиноидов в соцветиях

Для определения суммы каротиноидов в соцветиях бархатцев отклоненных нами была использована ранее разработанная на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии Самарского государственного медицинского университета методика определения суммы каротиноидов в пересчете на β -каротин в плодах шиповника [22]. Некоторые параметры методики были модифицированы под исследуемый нами объект (Приложение 5).

Нами было проведено сравнение каротиноидного состава соцветий семи исследуемых сортов бархатцев. Характеристики спектров поглощения для всех объектов схожи, однако они отличаются по интенсивности поглощения ввиду различий в концентрации анализируемых веществ (рис. 38 и 39).

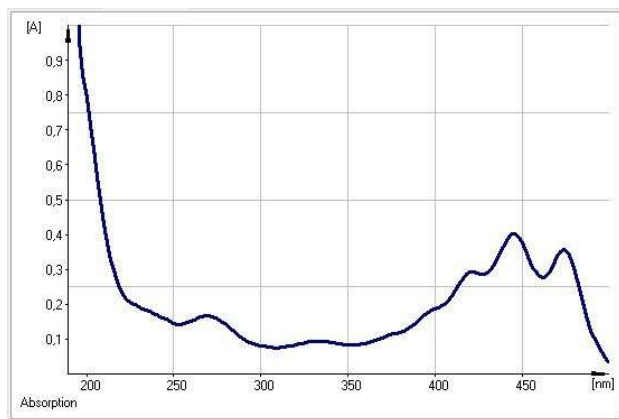


Рисунок 38 – Спектр поглощения испытуемого раствора (извлечение из соцветий бархатцев отклоненных сорта «Мандарин»).

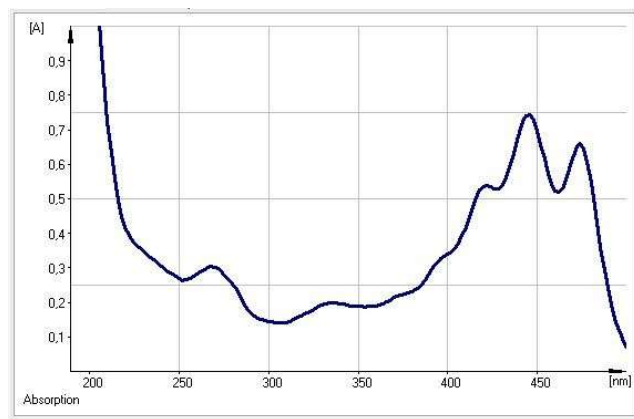


Рисунок 39 – Спектр поглощения испытуемого раствора (извлечение из соцветий бархатцев отклоненных сорта «Скарлет София»).

Результаты спектрофотометрического определения количественного содержания каротиноидов в соцветиях бархатцев отклоненных представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Количественное содержание суммы каротиноидов в соцветиях различных сортов бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.)

№ п/п	Сорт	Содержание суммы каротиноидов, мг% (в пересчете на β-каротин)
1.	<i>T. patula</i> L. «Оранжевое пламя»	172,72 ± 5,18
2.	<i>T. patula</i> L. «Скарлет София»	159,91 ± 4,79
3.	<i>T. patula</i> L. «Красная парча»	99,05 ± 2,97
4.	<i>T. patula</i> L. «Мандарин»	95,26 ± 2,85
5.	<i>T. patula</i> L. «Красный герой»	50,99 ± 1,50
6.	<i>T. patula</i> L. «Оранжевый чемпион»	44,73 ± 1,30
7.	<i>T. patula</i> L. «Малыш Гармония»	24,16 ± 0,72

По результатам проведенного эксперимента установлено, что содержание каротиноидов в исследуемых сортах бархатцев отклоненных имеет широкий диапазон значений. Сорта бархатцев отклоненных «Скарлет София» и «Оранжевое пламя» содержат высокие концентрации каротиноидов – до $159,91 \pm 15,99$ мг% и $172,72 \pm 17,27$ мг% соответственно. Сорта бархатцев отклоненных «Мандарин» и «Красная парча» содержат менее высокие концентрации каротиноидов, чем вышеупомянутые сорта бархатцев – до $95,26 \pm 9,53$ мг% и $99,05 \pm 9,91$ мг% соответственно.

Наиболее перспективными источниками каротиноидов являются соцветия бархатцев отклоненных сортов «Скарлет София» и «Оранжевое пламя».

5.5. Сравнительное фитохимическое исследование соцветий и травы *Tagetes patula* L.

По результатам проводимых нами исследований выявлен ряд особенностей хроматографических профилей изучаемых объектов (рис. 40).

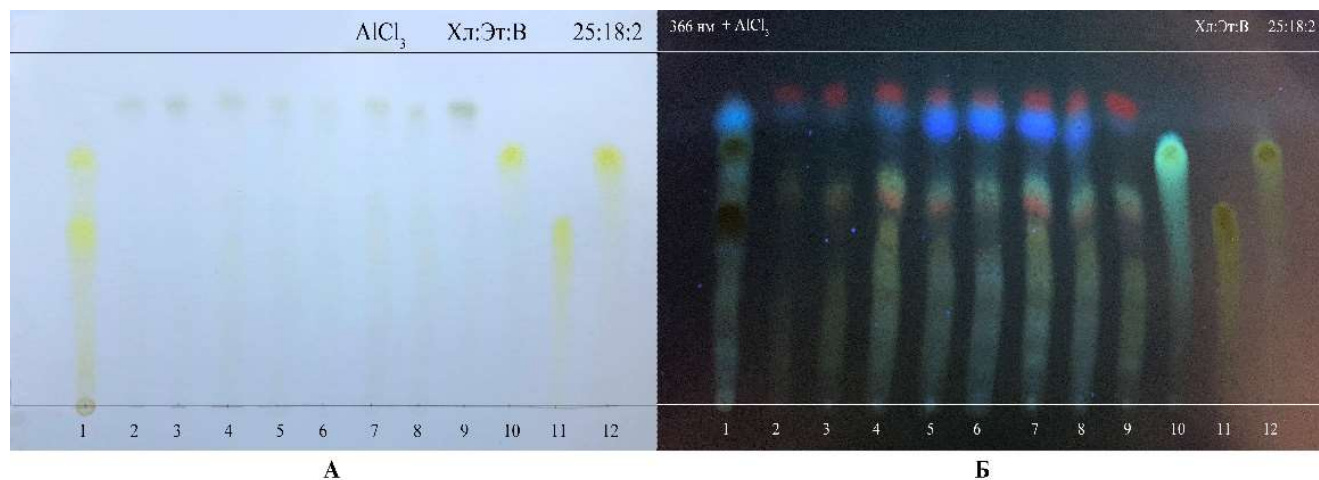


Рисунок 40 – Хроматограмма водно-спиртовых извлечений из травы и соцветий бархатцев отклоненных различных сортов в системе растворителей хлороформ–этанол–вода (25:18:2): А – обработка спиртовым раствором алюминия хлорида, Б – детекция в УФ - свете при длине волны 366 нм после обработки спиртовым раствором $AlCl_3$.

Обозначения: 1 – водно-спиртовое извлечение из соцветий бархатцев отклоненных; 2-9 – водно-спиртовые извлечения из травы различных сортов: 2 – сорт «Джипси Саншайн»;

3 – сорт «Кармен»; 4 – сорт «Красная парча»; 5 – сорт «Мандарин»;
6 – сорт «Красный герой»; 7 – сорт «Малыш Гармония»; 8 – сорт «Оранжевый чемпион»;
9 – сорт «Оранжевое пламя»; 10 – кверцетин; 11 – патулитрин; 12 – патулетин.

Исследованы извлечения из травы восьми различных сортов бархатцев отклоненных. Основываясь на полученных результатах ТСХ анализа, установлено все проанализированные сорта имеют схожий компонентный состав БАС. Определено, что наиболее информативными являются хроматограммы, полученные в системе растворителей: хлороформ – этанол 96% – вода (25:18:2), просматриваемые при длине волны 366 нм до и после обработки спиртовым раствором $AlCl_3$ (рис. 40).

Установлено, что флавоноидный состав проанализированных извлечений из травы бархатцев отклонённых отличается от извлечения из соцветий бархатцев отклоненных, в которой методом ТСХ в присутствии растворов стандартных образцов подтверждено наличие патулетина и патулитрина.

Для дальнейшего сравнения различных морфологических органов бархатцев отклоненных нами были проанализированы спектральные характеристики водно-спиртовых извлечений из соцветий и травы бархатцев отклоненных сорта «Мандарин» (рис. 41 и 42).

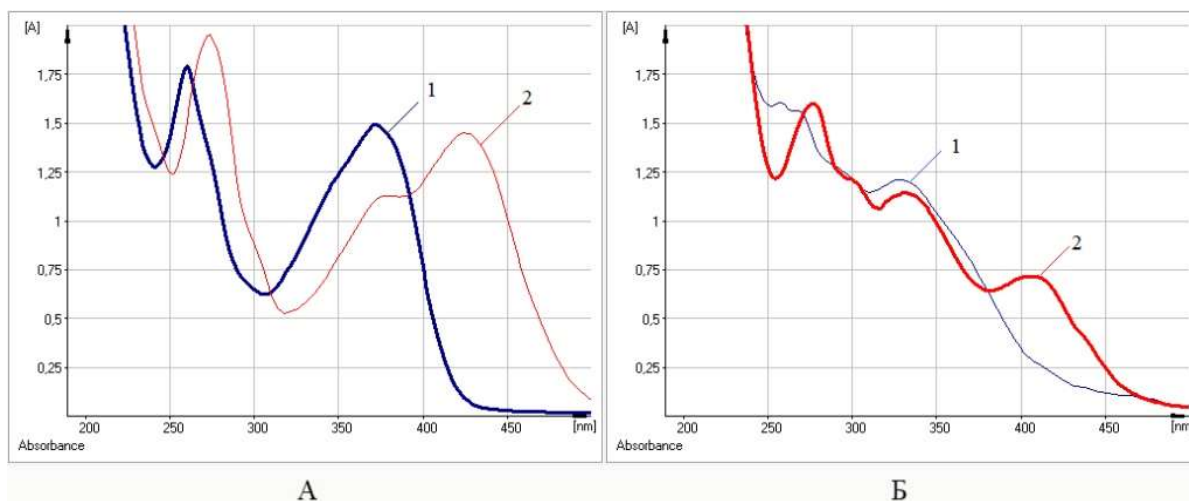


Рисунок 41– Электронные спектры растворов: А – водно-спиртового извлечения из соцветий бархатцев отклоненных сорта «Мандарин», Б – водно-спиртового извлечения из травы бархатцев отклоненных сорта «Мандарин».

Обозначения: 1 – исходный раствор; 2 – раствор с добавлением алюминия хлорида.

Характеристики спектров поглощения отличаются между собой. Определено, что в УФ-спектре изученных водно-спиртовых извлечений наблюдается батохромный сдвиг длинноволновой полосы флавоноидов (рис. 41).

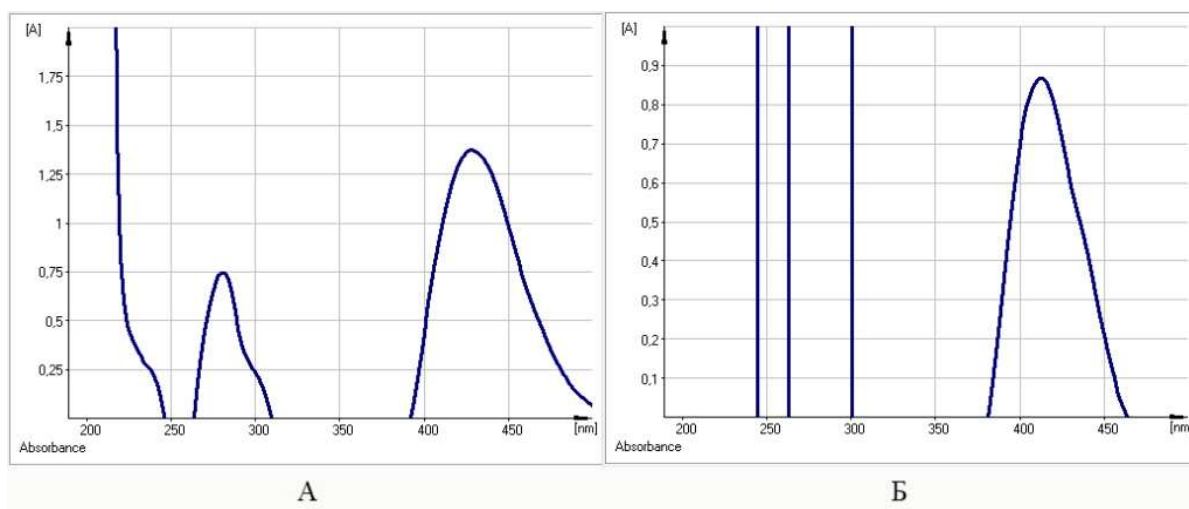


Рисунок 42 – Электронные спектры растворов (дифференциальный вариант): А – водно-спиртового извлечения из соцветий бархатцев отклоненных сорта «Мандарин», Б – водно-спиртового извлечения из травы бархатцев отклоненных сорта «Мандарин».

Дифференциальная кривая электронного спектра раствора водно-спиртового извлечения из цветков бархатцев отклоненных имеет максимум в области 428-434 нм, который практически соответствует максимуму поглощения спиртового раствора патулитрина, доминирующего флавоноида цветков бархатцев. Максимум поглощения кривой электронного спектра из травы бархатцев отклоненных, в свою очередь, находится в области 412-414 нм, что свидетельствует о различии в качественном флавоноидном составе изучаемых частей бархатцев отклоненных, а также о необходимости поиска оптимального стандартного образца для пересчета содержания суммы флавоноидов в траве бархатцев отклоненных (рис. 42).

5.6. Разработка методики количественного анализа содержания 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.

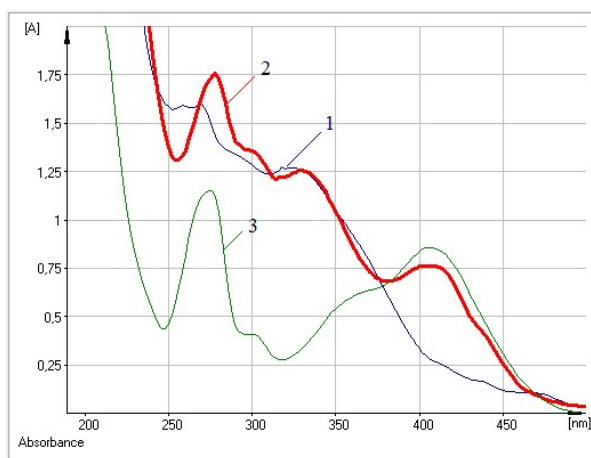


Рисунок 43 – Электронные спектры растворов водно-спиртового извлечения травы бархатцев отклоненных (1), извлечения в присутствии алюминия хлорида (2) и рутин в присутствии алюминия хлорида (3).

Установлено, что вещества, близкие по спектральным характеристикам к рутину, во многом определяют характер кривой поглощения водно-спиртового извлечения из травы бархатцев отклоненных (рис. 43). Определено, что в УФ-спектрах и раствора рутин, и раствора исследуемого извлечения с добавлением

спиртового раствора алюминия хлорида наблюдается bathochromный сдвиг длинноволновой полосы флавоноидов в область 404-408 нм (рис. 43).

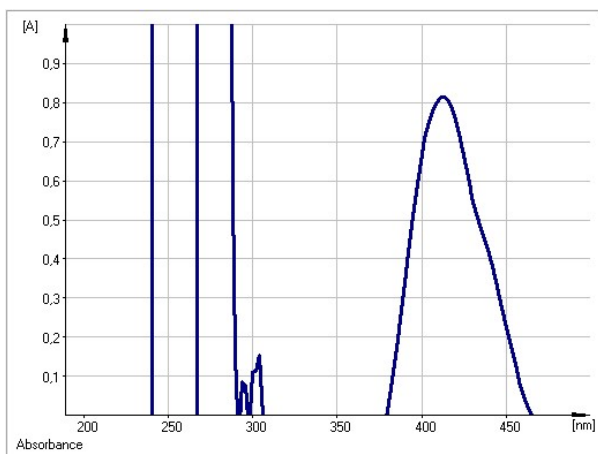


Рисунок 44 – Электронный спектр раствора водно-спиртового извлечения травы *T. patula* L. в условиях дифференциальной спектрофотометрии.

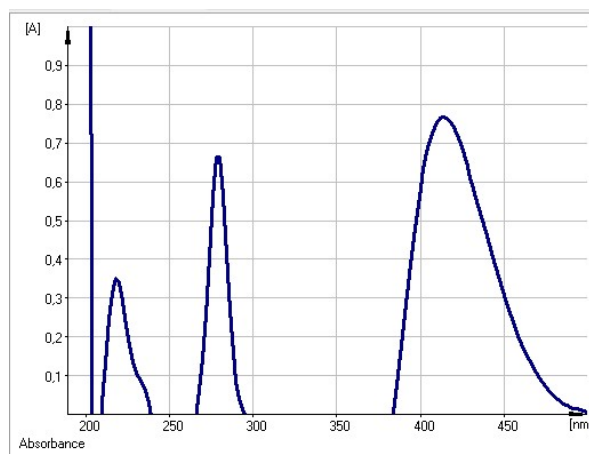


Рисунок 45 – Электронный спектр раствора рутина в условиях дифференциальной спектрофотометрии.

В УФ-спектре водно-спиртового извлечения из травы бархатцев отклоненных в дифференциальном варианте обнаруживается максимум поглощения при длине волны 412 нм ± 2 нм (рис. 44), который практически соответствует максимуму спиртового раствора рутина (дифференциальный вариант) (рис. 45).

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 на рутин и аналитическую длину волны 412 нм.

Результаты исследования зависимости различных параметров экстракции на выход флавоноидов из сырья (табл. 18) 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.

Таблица 18 – Влияние различных факторов экстракции на выход флавоноидов в извлечении из травы бархатцев отклоненных

Концентрация этилового спирта, %	Время экстракции, мин	Размер частиц сырья, мм	Соотношение сырье:экстрагент	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье, %
Экстрагент				
30	60	2	1:30	2,07 ± 0,05
40	60	2	1:30	2,21 ± 0,05
50	60	2	1:30	2,34 ± 0,05
60	60	2	1:30	2,66 ± 0,05
70	60	2	1:30	2,79 ± 0,05
80	60	2	1:30	2,24 ± 0,05
96	60	2	1:30	0,69 ± 0,05
Время экстрагирования				
70	30	2	1:30	2,82 ± 0,05
70	45	2	1:30	3,22 ± 0,05
70	60	2	1:30	2,78 ± 0,05
70	90	2	1:30	2,55 ± 0,05
70	120	2	1:30	2,00 ± 0,05
Размер частиц сырья				
70	45	1	1:30	3,76 ± 0,05
70	45	2	1:30	2,94 ± 0,05
70	45	3	1:30	2,16 ± 0,05
Соотношение сырье:экстрагент				
70	45	2	1:20	2,73 ± 0,05
70	45	2	1:30	2,81 ± 0,05
70	45	2	1:50	2,94 ± 0,05

Несмотря на большее значение содержания суммы флавоноидов в сырье со степенью измельчения 1 мм, данное значение обладает меньшей достоверностью в связи с увеличением вероятности попадания в исследуемый образец сырья цветков бархатцев отклоненных, значительно отличающихся по качественному и количественному содержанию флавоноидов.

В таблице 19 представлены параметры проведения анализа травы бархатцев отклоненных методом дифференциальной спектрофотометрии. Полный текст методики представлен в Приложении 6.

Таблица 19 – Параметры проведения количественного анализа суммы флавоноидов в траве бархатцев отклоненных

Метод исследования	Дифференциальная спектрофотометрия
Исследуемый объект	Трава бархатцев отклоненных
Размер частиц сырья, мм	2
Масса навески, г	1
Экстрагент	Этиловый спирт в концентрации 70%
Соотношение «Сырье:экстрагент»	1:50
Метод проведения экстракции	Однократная водно-спиртовая экстракция на водяной бане (умеренное кипение) с присоединением обратного холодильника
Время экстрагирования	45 мин.
Условия фильтрования извлечения	После охлаждения извлечения до комнатной температуры через фильтр с красной полосой
Испытуемый раствор	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

Раствор сравнения	1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу на 25 мл, доводят объем раствора до метки 96% этиловым спиртом
Стандартный образец	Рутин
Приготовление раствора СО: - навеска - объем мерной колбы - растворитель	- 0,02 г. - 50 мл. - спирт этиловый 70%
Испытуемый раствор СО	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 сравнения СО	2 мл полученного раствора помещают в мерную колбу на 25 мл, доводят объем раствора до метки 96% этиловым спиртом
Время ожидания реакции с раствором алюминия хлорида	30 мин.
Измеряемая величина	Оптическая плотность
Длина волны, при которой наблюдаются максимумы поглощения	412 нм.

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

$$X = \frac{D * m_0 * 50 * 2 * 25 * 100 * 100}{D_0 * m * 50 * 1 * 25 * (100 - W)}$$

где:

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – 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. 20).

Таблица 20 – 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.

Результаты спектрофотометрического определения количественного содержания флавоноидов в траве бархатцев отклоненных различных сортов представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Содержание суммы флавоноидов в траве различных сортов бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.)

№ п/п	Сорт	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин и абсолютно сухое сырье, %
1.	<i>T. patula</i> L. «Джипси Саншайн»	4,22 ± 0,05
2.	<i>T. patula</i> L. «Кармен»	3,84 ± 0,05
3.	<i>T. patula</i> L. «Красная парча»	3,72 ± 0,03
4.	<i>T. patula</i> L. «Красный герой»	3,44 ± 0,05
5.	<i>T. patula</i> L. «Мандарин»	3,26 ± 0,03
6.	<i>T. patula</i> L. «Оранжевый чемпион»	2,77 ± 0,05
7	<i>T. patula</i> L. «Оранжевое пламя»	1,64 ± 0,03

Определено, что содержание суммы флавоноидов в исследуемых образцах травы бархатцев отклоненных различных сортов варьирует от 1,64 ± 0,03% до 4,22 ± 0,05% (в пересчете на рутин).

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Проведено хроматографическое исследование соцветий бархатцев отклоненных методом ТСХ. Установлено, что наиболее информативными являются хроматограммы, полученные в системе растворителей: хлороформ – этанол – вода (25:18:2), просматриваемые при длине волны 366 нм до и после обработки спиртовым раствором $AlCl_3$.

2. Сравнительное хроматографическое исследование позволило выявить наличие флавоноидов (патулетина и патулитрина) в водно-спиртовых извлечениях из цветков бархатцев отклоненных семи различных сортов.

3. Кверцетин целесообразно использовать в качестве стандартного образца в методике определения подлинности цветков бархатцев отклоненных методом ТСХ, так как этот флавоноид имеет значение R_f 0,70, соответствующее значению R_f патулетина, являющегося наряду с патулитином диагностически значимым компонентом сырья данного растения.

4. Разработана методика определения подлинности соцветий бархатцев отклоненных методом ТСХ.

5. Разработана методика количественного анализа суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных в пересчете на доминирующий флавоноид – патулитрин.

6. Выявлено, что именно патулитрин (7-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидрокси-6-метоксифлавона) является доминирующим флавоноидом в соцветиях бархатцев отклоненных и определяет характер кривой поглощения водно-спиртового извлечения из данного растительного сырья. При проведении количественного анализа суммы флавоноидов в соцветиях бархатцев отклоненных целесообразно делать пересчет содержания действующих веществ на доминирующий и диагностически значимый флавоноид - патулитрин. Определено, что содержание суммы флавоноидов в исследуемых образцах соцветий бархатцев отклоненных различных сортов варьирует от $4,36 \pm 0,02\%$ до $11,71 \pm 0,05\%$.

7. Установлено количественное содержание суммы каротиноидов в соцветиях различных сортов бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.).

8. Проведено сравнительное фитохимическое исследование соцветий и травы *Tagetes patula* L. Установлено, что флавоноидный состав водно-спиртовых извлечений из травы бархатцев отклонённых значительно отличается от соцветий бархатцев отклоненных.

9. Проведен спектральный анализ водно-спиртовых извлечений из травы бархатцев отклонённых семи сортов. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в траве бархатцев отклоненных в пересчете на рутин. Установлено, что содержание суммы флавоноидов в исследуемых образцах травы бархатцев отклонённых различных сортов варьирует от $1,64 \pm 0,03\%$ до $4,22 \pm 0,05\%$.

ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГУСТОГО ЭКСТРАКТА ИЗ СОЦВЕТИЙ БАРХАТЦЕВ ОТКЛОНЕННЫХ, А ТАКЖЕ ИНДИВИДУАЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ НИХ

Для изучения фармакологической активности препаратов на основе соцветий бархатцев отклоненных нами был получен густой экстракт из этого вида сырья (табл. 22).

Таблица 22 – Стадии получения густого экстракта методом дробной модифицированной мацерации

Этапы	Описание технологических операций
Получение жидкого экстракта. Первый день.	В заранее подготовленные колбы (3 шт.) помещали по 50 г измельченных соцветий бархатцев отклоненных. Первую колбу заполняли 500 мл спирта этилового 70% (для замачивания и экстракции сырья) и дали настояться в течение суток при комнатной температуре. Во вторую колбу поместили 100 мл спирта этилового той же концентрации для замачивания сырья в течение суток.
Получение жидкого экстракта. Второй день.	Из первой колбы полученное извлечение переносили во вторую колбу и оставляли на сутки при комнатной температуре. В первую колбу добавили 250 мл экстрагента для настаивания в течение суток, в третью колбу – 100 мл для замачивания сырья.
Получение жидкого экстракта. Третий день.	Последовательно извлечение из второй колбы переносили в третью, а из первой – во вторую. 250 мл объемов чистого экстрагента добавили в первую колбу и оставили на сутки при комнатной температуре для замачивания.
Получение жидкого экстракта. Четвертый день.	Полученное в третьей колбе извлечение собрали в отдельную колбу для экстракта (1/3 от общего объема). Извлечение из второй колбы перенесли в третью. Первую колбу поместили на кипящую водяную баню в течение 30 минут с обратным

	холодильником для термической экстракции. После охлаждения до комнатной температуры извлечение перенесли во вторую колбу. Сырье из первой колбы является отработанным.
Получение жидкого экстракта. Пятый день.	Из третьей колбы получили дополнительную часть готовой продукции, перенесли в колбу для экстракта. Содержимое второй колбы в течение получаса подвергли термической экстракции, аналогичной той, что проходила в четвертый день. Остывшее извлечение из второй колбы перенесли в третью колбу и оставили при комнатной температуре на сутки. Сырье из 2-ой колбы является отработанным.
Получение жидкого экстракта. Шестой день.	Третью колбу поместили на кипящую водяную баню с обратным холодильником, в течение получаса проводили термическую экстракцию. После охлаждения полученное извлечение перенесли в колбу для готового экстракта. Сырье в третьей колбе является отработанным.
Очистка.	Очистку вытяжки осуществляли методом отстаивания при температуре не выше 10 °С в течение двух суток и последующей фильтрацией.
Получение густого экстракта.	Густой экстракт получали из жидкого путем упаривания под вакуумом при температуре 55 °С.

Методом дифференциальной спектрофотометрии определили содержание действующих веществ (флавоноидов) в густом экстракте, которое составило $17,27 \pm 0,07$ % (в пересчете на патулитрин).

Помимо густого экстракта были исследованы доминирующие флавоноиды, выделенные из соцветий – патулетин и патулитрин, с целью изучения их предполагаемой диуретической и нейротропной активности, свойственных группе БАС – флавоноидами.

6.1. Изучение диуретической активности густого экстракта и флавоноидов соцветий бархатцев отклоненных

Анализ полученных результатов исследования показал, что в 4-х часовом эксперименте при однократном введении густой экстракт соцветий бархатцев отклоненных в дозе 10 мг/кг у животных опытной группы относительно показателей водного контроля вызывал достоверное повышение почечной экскреции воды (на 35%) аналогично действию препарата сравнения фуросемида в пороговой дозе 1 мг/кг (табл. 23). Спустя 24 ч у животных данной опытной группы отмечалось достоверное повышение диуреза (на 28%) (табл. 23) относительно показателей контрольных животных аналогично действию препарата сравнения гипотиазид в эффективной средней терапевтической дозе 20 мг/кг, а также креатининуриза (на 42%) (табл. 24).

Таблица 23 – Показатели диуреза у крыс после введения густого экстракта соцветий бархатцев отклоненных, патулетина и патулитрина

Образец	Доза, мг/кг	Контроль через 4 ч ($M \pm m$), мл	Диурез через 4 ч		Контроль через 24 ч ($M \pm m$), мл	Диурез через 24 ч	
			($M \pm m$), мл	в % к контролю		($M \pm m$), мл	в % к контролю
Густой экстракт	10	1,34±0,11	1,79±0,09 *	135% *	2,17 ± 0,18	2,77 ± 0,19 *	128% *
Патулитрин	1		1,88 ± 0,13 **	140% **		2,54 ± 0,10	117%
Патулетин	1		1,61 ± 0,04 *	120% *		2,10 ± 0,11	97%
Фуросемид	1	1,98 ± 0,11	2,44 ± 0,13 *	123% *	-	-	-
Гипотиазид	20	-	-	-	2,73 ± 0,17	3,83 ± 0,22 **	140% **

* $p < 0,05$.
** $p < 0,01$.

В тоже время при однократном введении патулитрина в дозе 1 мг/кг у животных опытной группы относительно показателей водного контроля отмечался значительный рост почечной экскреции воды (на 40%) (табл. 23). Патулетин,

введенный внутривенно в аналогичной дозе, способствовал достоверному увеличению диуреза в опытной группе животных (на 20%). По силе диуретический эффект флавоноидов был сравним с эффектом препарата сравнения фуросемида в пороговой дозе 1 мг/кг. Следовательно, флавоноидный гликозид проявляет более выраженную мочегонную активность по сравнению с его агликоном. Спустя 24 ч диуретический эффект вышеуказанных флавоноидов цветков бархатцев отклоненных нивелировался.

Таблица 24 – Показатели креатининурина у крыс после введения экстракта соцветий бархатцев отклоненных, патулетина и патулитрина

Образец	Доза, мг/кг	Контроль через 4 ч ($M \pm m$), мг	Креатининурия через 4 ч		Контроль через 24 ч ($M \pm m$), мг	Креатининурия через 24 ч	
			($M \pm m$), мг	в % к контролю		($M \pm m$), мг	в % к контролю
Густой экстракт	10	0,12±0,06	0,10±0,02	83%	1,67 ± 0,14	2,37 ± 0,22 *	142% *
Патулитрин	1		0,15±0,06	125%		2,12 ± 0,30	127%
Патулетин	1		0,12±0,02	100%		1,96 ± 0,30	83%
Фуросемид	1	2,73 ± 0,29	3,14 ± 0,25	115%	-	-	-
Гипотиазид	20	-	-	-	5,27 ± 0,55	6,85 ± 0,59	130%
* $p < 0,05$.							
** $p < 0,01$.							

Таким образом, в ходе настоящего исследования проанализировано влияние густого экстракта и БАВ патулетина и патулитрина соцветий бархатцев отклоненных на выделительную функцию почек крыс. Установлено наличие ускоренной диуретической реакции (сравнимой с действием фуросемида в пороговой дозе 1 мг/кг) у всех трех исследуемых препаратов – густого экстракта и БАВ соцветий бархатцев отклоненных (патулетина и патулитрина). Кроме того, густой экстракт бархатцев проявил отсроченную диуретическую (аналогично действию гипотиазид) и креатининурическую реакцию (что свидетельствует об увеличении клубочковой фильтрации).

6.2. Изучение нейротропной активности густого экстракта соцветий и патулитрина

При изучении нейротропной активности исследуемые образцы вводили однократно внутрижелудочно через зонд на фоне 1% водной нагрузки. Дозы подбирались экспериментальным путем. Были изучены густой экстракт соцветий бархатцев отклоненных в дозах 50 и 10 мг/кг и патулитрин в дозах 0,5, 1 и 2 мг/кг.

В тесте Порсолта было установлено, что при однократном внутрижелудочном введении густого экстракта в дозе 50 мг/кг и патулитрина в дозах 0,5 и 1 мг/кг не отмечалось достоверного изменения двигательной активности опытных животных относительно водного контроля (табл. 25 и 26).

В то же время, при однократном введении густого экстракта соцветий бархатцев отклоненных в дозе 10 мг/кг наблюдалось достоверное значительное увеличение двигательной активности опытных животных относительно водного контроля (на 84%, $p=0,046$) (табл. 26).

Таблица 25 – Изучение нейротропной активности густого экстракта (ГЭ) соцветий бархатцев отклоненных (50 мг/кг) и патулитрина (0,5 мг/кг)

Исследуемые образцы	Двигательная активность животных за 5 мин, с	Двигательная активность животных за 5 мин, %	Достоверность отличий от опытных показателей контроля
Контроль (вода)	42,43±9,40	100%	-
ГЭ бархатцев, 50 мг/кг	34,71±8,69	82%	$p=0,558$
Патулитрин, 0,5 мг/кг	44,43±6,88	105%	$p=0,866$

Примечание: $p < 0,05$ - достоверность отличий данных опытной группы и контрольной группы.

Таблица 26 – Изучение нейротропной активности густого экстракта (ГЭ) соцветий бархатцев отклоненных (10 мг/кг) и патулитрина (1 мг/кг)

Исследуемые образцы	Двигательная активность животных за 5 мин, с	Двигательная активность животных за 5 мин, %	Достоверность отличий от опытных показателей контроля
Контроль (вода)	41,86±3,09	100%	-
ГЭ бархатцев, 10 мг/кг	77,00±15,44	184%	p=0,046
Патулитрин, 1 мг/кг	44,29±8,25	110%	p=0,787

Примечание: $p < 0,05$ - достоверность отличий данных опытной группы и контрольной группы.

В свою очередь патулитрин при однократном внутрижелудочном введении в дозе 2 мг/кг способствовал достоверному увеличению двигательной активности опытных животных относительно водного контроля (на 23%, $p=0,005$) (табл. 27).

Таблица 27 – Изучение нейротропной активности патулитрина (2 мг/кг)

Исследуемые образцы	Двигательная активность животных за 5 мин, с	Двигательная активность животных за 5 мин, %	Достоверность отличий от опытных показателей контроля
Контроль (вода)	49,43±1,84	100%	-
БАВ патулитрин, 2 мг/кг	60,71±3,97	123%	p=0,005

Примечание: $p < 0,05$ - достоверность отличий данных опытной группы и контрольной группы.

Таким образом, результаты свидетельствуют о способности густого экстракта и патулитрина оказывать антидепрессантное действие.

6.3. Изучение острой токсичности густого экстракта соцветий бархатцев отклоненных.

Анализ острой токсичности для экстракта густого соцветий бархатцев отклоненных проводили по методике, изложенной в главе 2.

В течение всего времени эксперимента, летальных случаев и нарушения поведенческой реакции среди животных зарегистрировано не было, поэтому на основании полученных данных можно сделать вывод, что в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76 «Система стандартов безопасности труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности» данный препарат относится к IV классу токсичности (малоопасные вещества).

Исходя из результатов исследования, можно сделать вывод, что препараты соцветий бархатцев отклоненных не содержат токсичных веществ и подходят для длительного применения в целях лечения и профилактики хронических заболеваний.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6.

1. Проведены исследования фармакологической активности экстракта густого соцветий бархатцев отклоненных, а также БАС патулитрина и патулетина. Установлено, что густой экстракт соцветий бархатцев, патулетин и патулитрин в 4-х ч эксперименте у животных опытной группы относительно показателей водного контроля достоверно возрастал диурез; к концу 24-х ч эксперимента с густым экстрактом отмечалось достоверное увеличение диуреза, а также креатининуриза (свидетельствующее о возрастании клубочковой фильтрации).

2. Изучено действие экстракта густого соцветий бархатцев отклоненных и патулитрина на ЦНС. Определено, что 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.

3. Определено, что соцветия бархатцев отклоненных являются перспективным видом лекарственного растительного сырья для получения эффективных и безопасных растительных лекарственных препаратов для лечения и профилактики различных заболеваний, в том числе хронических.

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 каналцы с пигментированным млечным соком в структуре жилок трубки венчика язычковых цветков; простые вытянутые волоски с волнистыми стенками на отгибе венчика трубчатого цветка; веерообразная 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 обёрток 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-, ¹H-ЯМР-, ¹³C-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 3,5,7,3¹,4¹-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-глюкопиранозид лупеола и 3-О-β-D-глюкопиранозид β-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 $\lambda_{\text{max}} = 412 \pm 2$ 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 литературы

1. Арслангереева, Х.Р. Качественное и количественное определение производных тиофена в соцветиях бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) / Х.Р. Арслангереева, О.А. Андреева, Н.М. Червонная // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. науч. тр. – Пятигорск, 2018. – С. 17-74.
2. Артюшенко, З.Т. Атлас по описательной морфологии высших растений. Плод. / З.Т. Артюшенко– Л.: Наука, 1986. – 300 с.
3. Астафьева, О.В. Исследование фенольных соединений и антиоксидантной активности экстрактов соцветий *Tagetes patula* L. / О.В. Астафьева, З.В. Жаркова, Г.Н. Генатуллина // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. – 2021. – Т. 15. – № 4. – С. 116-120. [Электронный ресурс] URL: <http://medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2021-4/e2021-4.pdf> (дата обращения: 17.05.2022).
4. Астафьева, О.В., Исследование химического состава и противомикробной активности экстрактов из соцветий *Tagetes patula* L. / О.В. Астафьева, З.В. Жаркова, М.В. Якимец, К.Ш. Арнаудова, Г.Н. Генатуллина, Г.А. Ростовшили // Современные проблемы науки и образования. – 2020. – № 6. [Электронный ресурс] URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=30430> (дата обращения: 23.06.2022).
5. Бахерт, К. Обзор опыта применения растительных препаратов для лечения острого риносинусита с позиции доказательной медицины / К. Бахерт // *Consilium Medicum*. – 2021. – Т. 23. – №9. – С. 430-440.
6. Бодруг, М.В. Биологические особенности, урожайность и химический состав эфирного масла *Tagetes signata* Bartl. при выращивании в Молдавии / М.В. Бодруг // Растительные ресурсы. – 1983. – Т. 19. – № 3. – С. 323-327.
7. Войткевич, С.А. Эфирные масла для парфюмерии и ароматерапии. / С.А. Войткевич– М.: Пищевая промышленность, 1999. – 284 с.
8. Воронков, А.В. Влияние флавоноидов: гесперидина и патулетина на вазодилатирующую функцию эндотелия сосудов головного мозга

экспериментальных животных на фоне его фокальной ишемии / А.В. Воронков, Э.Т. Оганесян, Д.И. Поздняков, О.С. Сивцева, Н.М. Червонная, О.А. Андреева // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2017. – № 19 (268). – С. 186-194.

9. Государственная фармакопея Российской Федерации / МЗ РФ. – XIV изд. – Т. I-IV. М., 2018. [Электронный ресурс] URL: <http://femb.ru/femb/pharmacopea.php> (дата обращения: 05.03.2022).

10. Гуров, А.В. Актуальные вопросы лечения хронического тонзиллита / А.В. Гуров, А.В. Мужичкова, А.А. Келеметов // Медицинский совет. – 2021. – №6. – С. 67-73.

11. Дудченко, Л. Г. Пряно-ароматические и пряно-вкусовые растения: Справочник / Л.Г. Дудченко, А.С. Козьяков, В.В. Кривенко– К.: Наукова думка. 1989. 304 с.

12. Зайцева, Е.Н. Устройство для введения водной нагрузки лабораторным животным / Е.Н. Зайцева, А.Р. Зайцев, А.В. Дубищев // Патент на полезную модель №115651. Приоритет ПМ 20.09.2011г. – №2011138631/13. Зарегистрировано в Государственном реестре ПМ РФ 10.05.2012г. Бюл. №13. 2 с.

13. Зыкова, И.Д. Исследование состава эфирного масла надземной части *Tagetes patula* L., культивируемых в Сибирском регионе / И.Д. Зыкова, Т.А. Кондратюк, А.А. Ефремов // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). – 2013. – Т. 117. – № 2. – С. 103-105.

14. Ишакаева, М.К. Тест Порсолт (Porsolt) в современной физиологии и медицине / М.К. Ишакаева // Научное и образовательное пространство: перспективы развития: сб. науч. тр. – Чебоксары, 2018. – С. 10-11.

15. Карписонова, Р.А. Бархатцы / Р.А. Карписонова // Большая российская энциклопедия. [Электронный ресурс] URL: <https://bigenc.ru/agriculture/text/1863600> (дата обращения: 09.06.2022).

16. Кащенко, Н.И. Фенольные соединения и полисахариды соцветий *Tagetes patula* / Н.И. Кащенко, Л.М. Танхаева, Д.Н. Оленников // Новые достижения

в химии и химической технологии растительного сырья: сб. науч. тр. – Барнаул, 2012. – С. 262-263.

17. Киселева, Т.Л. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества / Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова – М.: Проф. ассоц. Натуротерапевтов. – 2009. – 295 с.

18. Куркин, В.А. Фармакогнозия: учебник для студентов фармацевтических вузов (факультетов). / Куркин В.А. – 4-е изд., перераб. и доп. – Самара: ООО «Офорт»: ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России. 2019. – 1278 с.

19. Куркин, В.А. Современная фитотерапия как наука и учебная дисциплина в медицинском и фармацевтическом образовании / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, А.В. Куркина, О.Е. Правдивцева, В.Б. Браславский // Медицинский вестник Башкортостана. – 2016. – Т 11. – № 5 (65). – С. 149–152.

20. Куркин, В.А. Основы фитотерапии. / В.А. Куркин, Е.В. Авдеева, О.Е. Правдивцева, А.В. Куркина, В.Б. Браславский, В.М. Рыжов, В.В. Стеняева, Н.Р. Варина, П.В. Трифонова, О.В. Шарова, Л.В. Тарасенко, Е.В. Егорова – Самара: Самарский государственный медицинский университет, 2019. – 220 с.

21. Куркин, В.А. Разработка подходов к стандартизации листьев ореха черного методом ВЭЖХ / В.А. Куркин, Н.И. Зименкина, А.В. Помогайбин // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2021. – Т. 24. – № 12. – С. 24-35.

22. Куркин, В.А. Совершенствование методики количественного определения суммы каротиноидов в сырье «шиповника плоды» / В.А. Куркин, О.В. Шарова, П.В. Афанасьева // Химия растительного сырья. – 2020. – № 3. – С. 131-138.

23. Куркина, А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: монография / А.В. Куркина – Самара: ООО «Офорт», ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. – 290 с.

24. Куркина, А.В. Возможности фитотерапии при заболеваниях системы пищеварения / А.В. Куркина, В.Р. Галямова, В.А. Куркин, Е.В. Авдеева // Фармация и фармакология. – 2016. – Т. 4. – № 2 (15). – С. 26–40.

25. Ломкина, Е.М. Влияние экстракта бархатцев на заживление ран при сахарном диабете / Е.М. Ломкина, Н.М. Червонная, Д.В. Куркин, Е.В. Волотова, Д.А. Бакулин, Э.Т. Оганесян, О.А. Андреева, И.Н. Тюренков // – Фармация. – 2016. – Т. 65. – № 3. – С. 37-39.
26. Лотова, Л.И. Ботаника. Морфология и анатомия высших растений. / Л.И. Лотова – М.: Книжный дом "ЛИБРОКОМ", 2010. – 512 с.
27. Лютеин и зексантин: последние данные. РМЖ. Клиническая Офтальмология. – 2005. – №4. – С. 179. [Электронный ресурс] URL: https://www.rmj.ru/articles/oftalmologiya/Lyutein_i_zeksantin_poslednie_dannye/ (дата обращения: 04.03.2022).
28. Малюгина, Е.А. Определение количественного содержания основных биологически активных компонентов в соцветиях *Tagetes patula* L. / Е.А. Малюгина, А.В. Мазулин, Г.П. Смойловская // Научные труды Sworld. – 2015. – С. 48-52.
29. Малюгина, Е.А. Ранозаживляющая активность липофильного экстракта бархатцев прямостоячих / Е.А. Малюгина, Г.П. Смойловская, И.Ф. Беленичев, А.В. Мазулин, Т.В. Хортецка // Запорожский медицинский журнал. – 2019. – Т. 21. – № 2(113). – С. 253–257.
30. Марчишин, С.М. Определение флавоноидов и гидроксикоричных кислот в траве *Tagetes erecta* L., *Tagetes patula* L. и *Tagetes tenuifolia* Cav. методом ВЭЖХ / С.М. Марчишин, Т.С. Бердей, С.С. Козачок, О.Л. Демьдяк // Медицина и образование в Сибири. – 2013. – №6. – С. 46.
31. Мейер-Меликян Н.Р. Атлас пыльцевых зерен астровых (*Asteraceae*). Палиноморфология и развитие спородермы представителей семейства *Asteraceae* / Н.Р. Мейер-Меликян, И.Ю. Бовина, Я.В. Косенко, С.В. Полева, Е.Э. Северова, М.В. Теклёва, П.И. Токарев – М.: Т-во научных изданий КМК. – 2004. – С. 173-174.
32. Миназова, Г.И. Тонкослойная хроматография в анализе природного сырья / Г.И. Миназова // Башкирский химический журнал. – 2010. – Т. 17. – № 5. – С. 105-107.

33. Нащенкова, О.В. Применение биологически активных веществ в лечении возрастной макулодистрофии / О.В. Нащенкова // РМЖ. Клиническая Офтальмология. – 2004. – Т. 5. – № 2. – С. 82.
34. Никитин, А.А. Анатомический атлас полезных и некоторых ядовитых растений. / А.А. Никитин, И.А. Панкова– Л.: Наука, 1982. – 768 с.
35. Николаев, С.М. Желчегонная активность экстрактов сухих *Carthamus tinctorius* L., *Tagetes erecta* L. и *Calendula officinalis* L. / С.М. Николаев, Н.С. Бадмаев, З.Г. Самбуева, Д.Н. Оленников, Н.И. Кашенко // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2020. – № 3(175). – С. 76-79.
36. Оганесян, Э.Т. Способ получения гепатозащитного средства из цветков бархатцев распростертых (*Tagetes Patula* L.) / Оганесян Э.Т., Доркина Е.Г., Терехов А.Ю. Подгорная Ж.В. // Патент – № 2085217 Российская Федерация, МКИ А61 L15/00 К31/74 № 2007110014/15; заявл. 19.03.07; опубл. 30.09.2008, Бюл. № 10. 6 с.
37. Папаяни, О.И. Изучение химического состава и антимикробной активности сухого экстракта из цветков бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) / О.И. Папаяни, И.В. Духанина, Е.О. Сергеева // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2012. – Т. 14. – № 5 (3). – С. 745-747.
38. Патецкий, В.С. Эфирные масла и их качество / В.С. Патецкий, Л.А. Тимашева, О.А. Пехова, И.Л. Данилова, О.А. Серебрякова – Симферополь: ИТ "АРИАЛ", 2021. – 212 с.
39. Подгорная, Ж.В. Исследование цветков бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) с целью получения биологически активных соединений. [Текст]: дис. ... канд. фармацевт. наук. 15.00.02 / Подгорная Жанна Валериевна. – Пятигорск, 2008. – 190 с.
40. Самосудова, И.Е. Подбор экстрагента для оптимального извлечения суммы биологически активных веществ из цветков бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) / И.Е. Самосудова, Н.Н. Бойко, З.Е. Цветков // Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения: сб. научн. тр. – Москва, 2019. – С. 315-319.

41. Самылина, И.А. Фармакогнозия: учебник. / И.А. Самылина, Г.П. Яковлев– М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – Т. 1. – 976 с.
42. Тавлинова, Г.К. Бархатцы. / Г.К. Тавлинова– М.: ЗАО Центрополиграф, 2004. – 111 с.
43. Ткаченко, Н.А. Оптимизация параметров экстрагирования биологически активных веществ из цветов *Tagetes patula* / Н.А. Ткаченко, П.А. Некрасов, С.И. Викуль, Я.А. Гончарук // Научный вестник Львовского национального университета ветеринарной медицины и биотехнологий имени С.З. Гжицкого. – 2016. – Т. 18. – № 1 (65). – С. 122-130.
44. Федоров, А.А. Атлас по описательной морфологии высших растений. Соцветие. / А.А. Федоров, З.Т. Артюшенко– Л.: Наука, 1979. – 295 с.
45. Федоров, А.А. Атлас по описательной морфологии высших растений. Цветок. / А.А. Федоров, З.Т. Артюшенко– Л.: Наука, 1975. – 350 с.
46. Федоров, А.А. Атлас по описательной морфологии высших растений. Лист. / А.А. Федоров, М.Э. Кирпичников, З.Т. Артюшенко– М.-Л.: Изд-во АН СССР, 1956. – 300 с.
47. Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. / Р.У. Хабриев – М.: ОАО «Издательство «Медицин», 2005. – 832 с.
48. Холикова, О. Влияние эфирного масла бархатцев мелкоцветковых (*Tagetes Patula* L.) на некоторые биохимические процессы при токсическом гепатите / О. Холикова, Д.А. Азонов, Х.А. Ганиев // Colloquium-journal. – 2019. – №. 11 (35). – С. 49-52.
49. Червонная, Н.М. Изучение химического состава 40% спиртового извлечения из соцветий бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) / Н.М. Червонная // Сборник материалов 75-й открытой научно-практической конференции молодых ученых и студентов ВолгГМУ с международным участием "Актуальные проблемы экспериментальной и клинической медицины". – 2017. – С. 796.

50. Червонная, Н.М. Химический состав и биологическая активность гидрофильных фракций из соцветий бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) [Текст]: дис. ... канд. фармац. наук. 14.04.02 / Червонная Надежда Михайловна – Пятигорск, 2017. – 147 с.
51. Червонная, Н.М. Об антиоксидантной активности спирто-водных извлечений из цветков бархатцев распростертых / Н.М. Червонная, О.А. Андреева // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2-3. – С. 239.
52. Червонная, Н.М. О содержании фенольных соединений в соцветиях бархатцев распростертых (*tagetes patula* L.) / Н.М. Червонная, О.А. Андреева, С.Л. Аджиахметова, Э.Т. Оганесян // Химия растительного сырья. – 2018. – № 3. – С. 91-98.
53. Червонная, Н.М. О содержании дубильных веществ в соцветиях бархатцев распростёртых / Н.М. Червонная, О.А. Андреева, И.И. Харченко // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2016. – № 26 (247). – С. 147-151.
54. Червонная, Н.М. Способ получения стандарта патулетина из соцветий бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) / Н.М. Червонная, Э.Т. Оганесян, О.А. Андреева, С.П. Сенченко, Б.В. Боровский // Журнал научных статей Здоровье и образование в XXI веке. – 2017. – Т. 19. – № 6. – С. 132-137.
55. Червонная, Н.М. Определение некоторых физико-химических свойств пектиновых веществ из шрота соцветий бархатцев распростертых (*Tagetes patula* L.) / Н.М. Червонная, И.И. Харченко, С.Л. Аджиахметова, Л.П. Мыкоц, О.А. Андреева, Э.Т. Оганесян // Фармация и фармакология. – 2017. – Т. 5. – № 3. – С. 267-282.
56. Adams, D. W. Restoring American Gardens: An Encyclopedia of Heirloom Ornamental Plants, 1640-1940. / D.W. Adams – Oregon: Timber Press, 2004. – 420 p.
57. Ahmad, M. Checklist of medicinal flora of tehsil Isakhel, district Mianwali-Pakistan / M. Ahmad // Ethnobotanical Leaflets. – 2006. – Vol. 1. – P. 4.
58. Alvarado-Sansininea, J.J. Quercetagetin and Patuletin: Antiproliferative, Necrotic and Apoptotic Activity in Tumor Cell Lines / J.J. Alvarado-Sansininea, L.

Sanchez-Sanchez, H. Lopez-Munoz, M.L. Escobar, F. Flores-Guzman, R. Tavera-Hernandez, M. Jimenez-Estrada // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23 (10). – Article ID: 2579. DOI: 10.3390/molecules23102579

59. Armas, K. Comparative Study of the Chemical Composition of Essential Oils of Five *Tagetes* Species Collected in Venezuela / K. Armas, J. Rojas, L.B. Rojas, A. Morales // *Natural Product Communications*. – 2012. – Vol. 7. – No. 9. – P. 1225-1226.

60. Azhar, M. Cytotoxic and genotoxic action of *Tagetes patula* flower methanol extract and patuletin using the *Allium* test / M. Azhar, A.D. Farooq, S. Haque, S. Bano, Z. Lubna, S. Faizi // *Turkish Journal of Biology*. – 2019. – Vol. 43. – No. 5. – P. 326-339.

61. Aziz, M.A. Ethno-medicinal survey of important plants practiced by indigenous community at Ladha subdivision, South Waziristan agency, Pakistan / M.A. Aziz, M. Adnan, A.H. Khan, A.U. Rehman, R. Jan, J. Khan // *Journal of ethnobiology and ethnomedicine*. – 2016. – Vol. 12. – No. 1. – P. 53.

62. Bano, S. Nematicidal activity of flavonoids with structure activity relationship (SAR) studies against root knot nematode *Meloidogyne incognita* / S. Bano, E.Y. Iqbal, Z. Lubna, S. Zik-ur-Rehman, S. Fayyaz, S. Faizi // *European Journal of Plant Pathology*. – 2020. – Vol. 157. – No. 2. – P. 299-309.

63. Bano, S. Isolation of Ceramides from *Tagetes patula* L. Yellow Flowers and Nematicidal Activity of the Fractions and Pure Compounds against Cyst Nematode, *Heterodera zae* / S. Bano, F. Shaheen, S. Lubna, S. Fayyaz, E.Y. Iqbal // *Chemistry and Biodiversity*. – 2019. – Vol. 16. – No. 6. – Article ID: e1900092. DOI: 10.1002/cbdv.201900092.

64. Benea, A. Determination of carotenoids in extracts from species of *Tagetes* and *Calendula* / A. Benea, C. Ciobanu, M. Cojocaru-Toma, N. Ciobanu // *The Moldovan Medical Journal*. – 2020. – No. 64 (4). – P. 23-26.

65. Bhardwaj, D.K. Quercetagenin 5-methyl ether from the petals of *Tagetes patula* / D.K. Bhardwaj, M.S. Bisht, S.C. Uain, C.K. Mehta, G.C. Sharma // *Phytochemistry*. – 1980. – Vol. 19. – P. 713–714.

66. Bohm, B.A. Flavonoids of the Sunflower Family (*Asteraceae*) / B.A. Bohm, T.F. Stuessy – New York: Springer-Verlag Wein, 2001. – 831 p.

67. Bown, D. *Encyclopaedia of Herbs and their Uses* / D. Bown // London: Dorling Kindersley Limited, 1995. – 432 c.
68. Breithaupt, D.E. Differentiation between lutein monoester regioisomers and detection of lutein diesters from marigold flowers (*Tagetes erecta* L.) and several fruits by liquid chromatography-mass spectrometry / D.E. Breithaupt, U. Wirt, A. Bamedi // *Journal of agricultural and food chemistry*. – 2002. – Vol. 50. – No. 1. – P. 66-70.
69. Chkhikvishvili, I. Constituents of French Marigold (*Tagetes patula* L.) Flowers Protect Jurkat T-Cells against Oxidative Stress / I. Chkhikvishvili, T. Sanikidze, N. Gogia, M. Ehlukidze, M. Machavariani, N. Kipiani, Y. Vinokur, V. Rodov // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2016. – Vol. 2016. – Article ID: 4216285.
70. Cicevan, R. Biological Traits and Genetic Relationships Amongst Cultivars of Three Species of *Tagetes* (*Asteraceae*) / R. Cicevan, A.F. Sestras, M. Plazas, M. Boscaiu, S. Vilanova, P. Gramazio, O. Vicente, J. Prohens, R.E. Sestras // *Plants*. – 2022. – Vol. 11. – Article ID: 760. DOI: 10.3390/plants11060760
71. Doctor, V. Marigold: The Mexican flower that has become a part of Indian festivals / V. Doctor // *Economic Times*. – 2017. [Электронный ресурс] URL: <https://economictimes.indiatimes.com/blogs/onmyplate/marigold-the-mexican-flower-that-has-become-a-part-of-indian-festivals/>
72. Fabrick, J.A. Insecticidal activity of marigold *Tagetes patula* plants and foliar extracts against the hemipteran pests, *Lygus hesperus* and *Bemisia tabaci* / J.A. Fabrick, A.J. Yool, D.W. Spurgeon // *PLoS ONE*. – 2020. – Vol. 15. – No. 5. – Article ID: e0233511. DOI: 10.1371/journal.pone.0233511
73. Faizi, S. Bioassay-guided isolation of antioxidant agents with analgesic properties from flowers of *Tagetes patula* / S. Faizi, A. Dar, H. Siddiqi, S. Naqvi, A. Naz, S. Bano, Z. Lubna // *Pharmaceutical Biology*. – 2011. – Vol. 49. – No. 5. – P. 516-525.
74. Faizi, S. Antibacterial and antifungal activities of different parts of *Tagetes patula*: Preparation of patuletin derivatives / S. Faizi, H. Siddiqi, S. Bano, A. Nez, Z. Lubna, K. Mazhar, S. Nasim, T. Raiz, S. Kamal, A. Ahmad, S.A. Khan // *Pharmaceutical Biology*. – 2008. – Vol. 46. – No. 5. – P. 309-320.

75. Farooq, S. Ethnobotanical studies of the flora of tehsil Birmal in South Waziristan Agency, Pakistan / S. Farooq, A. Barki, M. Yousaf Khan, H. Fazal // Pakistan journal of weed science research. – 2012. – Vol. 18. – No. 3. – P. 277-291.

76. Garg, S.N. A new acyclic monoterpene glucoside from the capitula of *Tagetes patula* / S.N. Garg, R. Charles, S. Kumar // Fitoterapia. – 1999. – Vol. 70. – No. 5. – P. 472–474.

77. Garg, S.N. Identification of the volatile constituents in the capitula oil of *Tagetes patula* L. grown in the North Indian plains / S.N. Garg, S.K. Verma, S. Kumar // Journal of Essential Oil Research. – 1999. – Vol. 11. – No. 6. – P. 688–690.

78. Garther, D.C. Lutein and zeaxanthin – new perspectives for preservation of eye health. / D.C. Garther // РМЖ. Клиническая Офтальмология. – 2005. – №1. – С. 13. [Электронный ресурс] URL: https://www.rmj.ru/articles/oftalmologiya/Lyutein_i_zeaksantin__novye_perspektivy_d_lya_sohraneniya_zdorovyya_glaz/

79. Gongadze, M. French marigold (*Tagetes patula* L.) flower extract protects kidney cells from inflammation in vitro / M. Gongadze, M. Machavariani, M. Enukidze, N. Gogia, M. Iobadze, I. Chkhikvishvili // Georgian medical news. – 2019. – Vol. 297. – P. 154-157.

80. Guinot, P. Primary flavonoids in marigold dye: Extraction, structure and involvement in the dyeing process / P. Guinot, A. Gargadennec, G. Valette, A. Fruchier, C. Andary // Phytochemical Analysis. – 2008. – Vol. 19. – No. 1. – P. 46-51.

81. Ivancheva, S. Flavonoids in *Tagetes patula* / S. Ivancheva, M. Zdravkova // Fitoterapia-Milano. – 1993. – Vol. 64. – P 555.

82. Jabeen, A. Anti-TNF- α and anti-arthritic effect of patuletin: A rare flavonoid from *Tagetes patula* / A. Jabeen, M.A. Mesaik, S.U. Simjee, Z. Lubna, S. Bano, S. Faizi // International immunopharmacology. – 2016. – Vol. 36. – P. 232-240. DOI: 10.1016/j.intimp.2016.04.034.

83. Kafaltiya, M. Chemical composition of the essential oils of *Tagetes patula* L. during different phenological stages / M. Kafaltiya, H. Lohani, Z. Haider, N.K.

Chauhan, N. Joshi // Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences. – 2019. – Vol. 12. – No. 4. – P. 117-122.

84. Kashif, M. Cytotoxic and antioxidant properties of phenolic compounds from *Tagetes patula* flower / M. Kashif, S. Bano, S. Naqvi, S. Faizi, Z. Lubna, M.M. Ahmed., K.S. Azeemi, A.D. Farooq // Pharmaceutical Biology. – 2015. – Vol. 53. – No. 5. – P. 672-681.

85. Krzyzaniak, L.M. Larvicidal Activity against *Aedes aegypti* and Chemical Characterization of the Inflorescences of *Tagetes patula* / L.M. Krzyzaniak, T.M. Antonelli-Ushirobira, G. Panizzon, A.L. Sereia, J.R.P.D. Souza, J.A.C. Zequi, C.R. Novello, G.C. Lopes, D.C.D. Medeiros, D.B. Silva, E.V.D.S. Leite-Mello, J.C.P.D. Mello // Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. – 2017. – Vol. 2017. – Article ID: 9602368. DOI: 10.1155/2017/9602368

86. Lee, I.S. Antimelanogenic activity of patuletin from *Inula japonica* flowers in B16F10 melanoma cells and zebrafish embryos / I.S. Lee, J.H. Kim // Natural Product Research. – 2021. Dec 22. – P. 1-4.

87. Li, G-. Y. A new disubstituted succinate from the roots of *tagetes erecta* / G.Y. Li, X.Y. Lü, J.P. Jian, D.D. Zhu, Y. Liu, C.Y. Lü, Y.Y. Guo, S.W. Lü // Yaoxue Xuebao. – 2019. – Vol. 54. – No. 8. – P. 1457-1460.

88. Liu, L. Chemical Constituents of *Tagetes patula* and Their Neuroprotecting Action / L. Liu, S. Luo, M. Yu, A.M. Metwaly, X. Ran, C. Ma, D. Dou, D. Cai // Natural Product Communications. – 2020. – Vol. 15. – No. 11. – P. 1-8. DOI: 10.1177/1934578X20974507

89. Liu, X. Mechanism Investigation of *Tagetes patula* L. Against chronic nonbacterial prostatitis by metabolomics and network pharmacology / X. Liu, X. Ran, M. Riaz, H. Kuang, D. Dou, D. Cai // Molecules. – 2019. – Vol. 24. – No. 12. – Article ID: 2266. DOI:10.3390/molecules24122266

90. Mabry, T.J. The Systematic Identification of Flavonoids / T.J. Mabry, K.R. Markham, M.B. Thomas – Berlin-Heidelberg-New York: Springer Verlag, 1970. – 707 p.

91. Maity, N. Exploring *Tagetes erecta* Linn flower for the elastase, hyaluronidase and MMP-1 inhibitory activity / N. Maity, N. Nema, K. Abedy, B. Sarkar, P. Mukherjee // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2011. – Vol. 11. – No. 137(3). – P.1300-1305.
92. Maity, N. Development of RP-HPLC Method for the Estimation of β -Amyrin and Syringic Acid from Marigold Flower / N. Maity, S. Pandit, N. Nema, B. Sarkar, P. Mukherjee // *Planta Medica*. – 2012. – Vol. 78. – Article ID: PI108.
93. Mashkovska, S. Volatile emissions of genus *Tagetes* L. species / S. Mashkovska // *Plant Introduction*. – 2001. – Vol. 9. – P. 85-91.
94. Miao, X. Phytoremediation for Co-contaminated Soils of Cadmium and Polychlorinated Biphenyls Using the Ornamental Plant *Tagetes patula* L. / X. Miao, R.R. Kumar, Q. Shen, Z. Wang, Q. Zhao, J. Singh, S. Paul, W. Wang, X. Shang // *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. – 2022. – Vol. 108. – No. 1. – P. 129-135. DOI: 10.1007/s00128-021-03392-4
95. Moghaddam, M. Chemical Compositions of Essential Oil from the Aerial Parts of *Tagetes patula* L. and *Tagetes erecta* L. Cultivated in Northeastern Iran / M. Moghaddam, A.G. Pirbalouti, K. Babaei, N. Farhadi // *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*. – 2021. – Vol. 25. – No 5. – P. 990-997. DOI: 10.1080/0972060X.2021.2005691
96. Munhoz, V.M. Extraction of flavonoids from *Tagetes patula*: Process optimization and screening for biological activity / V.M. Munhoz, R. Longhini, J.R.P. Souza, J.A.C. Zequi, E.V.S.L. Mello, G.C. Lopes, J.C.P. Mello // *Revista Brasileira de Farmacognosia*. – 2014. – Vol. 24. – No. 5. – P. 576-583.
97. Parvaiz, M. Ethnobotanical studies on plant resources of Mangowal, District Gujrat, Punjab, Pakistan / M. Parvaiz // *Avicenna journal of phytomedicine*. – 2014. – Vol 4. – No. 5. – P. 364.
98. Piccaglia, R. Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *T. erecta* / R. Piccaglia, M. Marotti, S. Grandi // *Industrial Crops and Products*. – 1998. – Vol. 8. – P. 45-51.
99. Politi, F.A.S. Anthelmintic activity of a nanoformulation based on thiophenes identified in *Tagetes patula* L. (*Asteraceae*) against the small ruminant

nematode *Haemonchus contortus* / F.A.S. Politi, R.V. Bueno, L.A. Zeoly, R.R. Fantatto, J.O. Eloy, M. Chorilli, R.V.C. Guido, A.C.S. Cagas, M. Furlan // *Acta Tropica*. – 2021. – Vol. 219. – Article ID: 105920. DOI: 10.1016/j.actatropica.2021.105920

100. Politi, F.A.S. Antifungal, antiradical and cytotoxic activities of extractives obtained from *Tagetes patula* L. (*Asteraceae*), a potential acaricide plant species / F.A.S. Politi, G.M. Queiroz-Fernandes, E.R. Rodrigues, J.A. Freitas, R.C.L.R. Pietro // *Microbial Pathogenesis*. – 2016. – Vol. 95. – P. 15-20.

101. Priyanka, D. A brief study on marigold (*Tagetes species*): a review / D. Priyanka, T. Shalini, V.K. Navneet // *International Research Journal of Pharmacy*. – 2013. – Vol. 4. – No. 1. – P. 43-48.

102. Rahman, A. Medico-botany on herbaceous plants of Rajshahi, Bangladesh / A. Rahman, S.K. Nitu, Z. Ferdows, A. Islam // *American Journal of Life Sciences*. – 2013. – Vol. 1. – No. 3. – P. 136-144.

103. Riaz, M. Traditional uses, Phyto-chemistry and pharmacological activities of *Tagetes Patula* L. / M. Riaz, R. Ahmad, N.U. Rahman, Z. Khan, D. Dou, G. Sachel, R. Manea // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2020. – Vol. 225. – Article ID: 112718. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112718

104. Robak, J. Screening of the influence of flavonoids on lipooxygenase and cyclooxygenase activity, as well as on nonenzymic lipid oxidation / J. Robak, F. Shridi, W. Wolbis, M. Krolokowska // *Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy*. – 1988. – Vol. 40(5). – P. 451-458.

105. Safar, A.A. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of *Tagetes patula* L. essential oil raised in Erbil, Iraq / A.A. Safar, A. Ghafoor, D. Dastan // *Journal of Reports in Pharmaceutical Sciences*. – 2020. – Vol. 9. – No. 1. – P. 59-67. DOI: 10.4103/jrptps.JRPTPS_68_19

106. Saleem, R. Hypertensive and Toxicological Study of Citric Acid and Other Constituents from *Tagetes patula* Roots / R. Saleem, M. Ahmad, A. Naz, H. Siddiqui, S. Iqbal, S. Faizi // *Archives of Pharmacal Research*. – 2004. – Vol. 27. – P. 1037-1042.

107. Salehi, B. *Tagetes* spp. Essential oils and other extracts: Chemical characterization and biological activity / B. Salehi, M. Valussi, M.F. Morais-Braga, J.N.

Carneiro, A.L. Leal, H.D. Coutinho, S. Vitalini, D. Kręgiel, H. Antolak, M. Sharifi-Rad, N.C. Silva, Z. Yousaf, M. Martorell, M. Iriti, S. Carradori, J. Sharifi-Rad // *Molecules*. – 2018. – Vol. 23(11). – Article ID: 2847. DOI: 10.3390/molecules23112847.

108. Sanae, K. Three Routes to Orange Petal Color via Carotenoid Components in 9 Compositae Species / K. Sanae, S. Katsuhiko, Y. Masafumi, N. Masayoshi, O. Akemi // *Japanese Society for Horticultural Science*. – 2007. – Vol. 76. – No. 3. – P. 250-257.

109. Šivel, M. Lutein Content in Marigold Flower (*Tagetes erecta* L.) Concentrates used for Production of Food Supplements / M. Šivel, S. Kracmar, M. Fišera, B. Klejdus, V. Kubáň // *Czech Journal of Food Sciences*. – 2014. – Vol. 32. – P. 521-525.

110. Step, E. Favourite Flowers of Garden and Greenhouse. / E. Step, D. Bois, B. Herincq, W. Watson, F. Warne – Vol. II. London: Frederick Warne & Co, 1897. – 323 p. [Электронный ресурс] URL: <https://www.semanticscholar.org/paper/Favourite-Flowers-of-Garden-and-Greenhouse-Step-Bois/2c798ffcece4d107e3e3a8c517c19fdb5862ef93>.

111. Subagio, A. Stability of Lutein and Its Myristate Esters / A. Subagio, H. Wakaki, N. Morita // *Biosci Biotechnol Biochem*. – 1999. – Vol 63. – No. 10. – P. 1784-1786.

112. Sultana, S. Indigenous knowledge of folk herbal medicines by the women of district Chakwal, Pakistan / S. Sultana // *Ethnobotanical Leaflets*. – 2006. – Vol. 1. – P. 26.

113. Szarka, Sz. GC and GC-MS Studies on the Essential Oil and Thiophenes from *Tagetes patula* L. / Sz. Szarka, E. Hethelyi, E. Lemberkovics, I.N. Kuzovkina, P. Banyai, E. Szoke // *Chromatographia*. – 2006. – Vol. 63. – P. 67-73.

114. Vasudevan, P. *Tagetes*: a multipurpose plant / P. Vasudevan, S. Kashyap, S. Sharma // *Bioresource Technology*. – 1997. – Vol. 62. – No. 1. – P. 29-35.

115. Voronkov, A.V. Effect of pumpkin (*Cucurbita Pepo* L.) and marigold (*Tagetes patula* L.) extracts on hippocampal mitochondria functional activity within conditions of experimental acute brain hypometabolism / A.V. Voronkov, D.I. Pozdnyakov, S.L. Adzhiakhmetova, N.M. Chervonnaya, K.A. Miroshnichenko, A.V.

Sosnovskaya, E.I. Chereshkova // Farmatsiya i Farmakologiya. – 2019. – Vol. 7. – No. 4. – P. 198-207.

116. Wang, X. Progress in insecticidal plant marigold, *Tagetes erecta* / X. Wang, H. Xu, S. Zhao // Journal of Xi'an United University. – 2001. – Vol. 5. – No. 2. – P. 5-10.

117. Wang, Y. Chemical constituents of stems and leaves of *Tagetes patula* L. and its fingerprint / Y. Wang, X. Ran, M. Riaz, M. Yu, Q. Cia, D. Dou, A.M. Metwaly, T. Kang, D. Cia // Molecules. – 2019. – Vol. 24. – No. 21. – Article ID: 3911. DOI: 10.3390/molecules24213911.

118. Wang, Y. Comparative effects of *Tagetes patula* L. extraction, mercaptopyalgorskite immobilisation, and the combination thereof on Cd accumulation by wheat in Cd-contaminated soil / Y. Wang, Y. Xu, G. Sun, X. Liang, Y. Sun, L. Wang, Q. Huang // Ecotoxicology and Environmental Safety. – 2021. – Vol. 224. – Article ID: 112639 DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.112639

119. Yasukawa, K. Effects of Flavonoids from French Marigold (Florets of *Tagetes patula* L.) on Acute Inflammation Model / K. Yasukawa, Y. Kasahara // International Journal of Inflammation. – 2013. – Vol. 2013. – Article ID 309496.

120. Zhu, W. Patuletin induces apoptosis of human breast cancer SK-BR-3 cell line via inhibiting fatty acid synthase gene expression and activity / W. Zhu, C. Lv, J. Wang, Q. Gao, H. Zhu, H. Wen // Oncology letters. – 2017. – Vol. 14 (6). – P. 7449-7454.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение 1. Патент на изобретение «Способ количественного определения суммы флавоноидов в цветках бархатцев отклоненных»

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2772821

**СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ЦВЕТКАХ БАРХАТЦЕВ
ОТКЛОНЕННЫХ**

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

Авторы: *Куркин Владимир Александрович (RU), Савельева Анна Евгеньевна (RU), Куркина Анна Владимировна (RU)*

Заявка № 2021111797

Приоритет изобретения **23 апреля 2021 г.**

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **26 мая 2022 г.**

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **23 апреля 2041 г.**

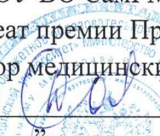


*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

Ю.С. Зубов

Приложение 2. Акты внедрения результатов диссертационной работы.

“Утверждаю”

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

И.Л. Давыдкин
“ _____ ” _____ 2022 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы
Савельевой Анны Евгеньевны «Фармакогностическое исследование бархатцев
отклоненных (*Tagetes patula* 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.х.н. доцента
Шариповой С.Х., доцента кафедры, к.б.н., доцента Расцветовой Н.В.,
подтверждает использование материалов диссертационного исследования
Савельевой А.Е., посвященного изучению вопросов фитохимической диагностики,
обоснованию подходов к стандартизации лекарственного сырья и препаратов на
основе бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.) в учебном процессе при
проведении практических занятий со студентами и ординаторами, а также научно-
исследовательской работе в области изучения лекарственного растительного
сырья, содержащего флавоноиды.

Внедренные результаты способствуют повышению объективности
стандартизации лекарственных препаратов на основе лекарственного
растительного сырья бархатцев отклоненных.

Члены комиссии:

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



А.В. Воронин

Доцент кафедры химии института фармации
к. х. н., доцент



С.Х. Шарипова

Доцент кафедры химии института фармации
к. б. 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
“ 14 ” апреля 2022 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы
Савельевой Анны Евгеньевны «Фармакогностическое исследование бархатцев
отклоненных (*Tagetes patula* L.)» на соискание ученой степени кандидата
фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия,
фармакогнозия 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 А.В. Куркиной, профессора кафедры, д.фарм.н., профессора С.В. Первушкина, доцента кафедры, к.фарм.н., доцента Л.Д. Климовой, подтверждает использование материалов научно-исследовательской работы Савельевой А.Е., посвященной изучению химического состава и обоснованию использования в медицине лекарственного растительного сырья и лекарственных препаратов на основе бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* 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 бархатцев отклоненных 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

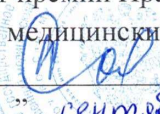
Профессор кафедры фармацевтической
технологии с курсом биотехнологий,
д. фарм. н., профессор

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
“ 15 ” сентября 2022 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы
Савельевой Анны Евгеньевны «Фармакогностическое исследование бархатцев
отклоненных (*Tagetes patula* L.)» на соискание ученой степени кандидата
фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия,
фармакогнозия 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 Савельевой А.Е., посвященного изучению вопросов фитохимической и морфолого-анатомической диагностики, обоснованию подходов к стандартизации лекарственного сырья и препаратов на основе бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.) в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами и ординаторами, а также в научно-исследовательской работе. Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации исследуемого 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
“ 15 ” сентября 2022 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы
Савельевой Анны Евгеньевны «Фармакогностическое исследование бархатцев
отклоненных (*Tagetes patula* L.)» на соискание ученой степени кандидата
фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия,
фармакогнозия 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., доцент И.К. Петрухиной, профессора кафедры, д.фарм.н.,
доцента Е.П. Гладуновой, доцента кафедры, к.фарм.н., доцента Е.Л.
Абдулмановой, подтверждает использование материалов исследования Савельевой
А.Е., посвященного изучению химического состава и разработке подходов к
стандартизации лекарственного растительного сырья бархатцев отклоненных в
учебном процессе при проведении практических занятий со студентами, а также в
научно-исследовательской работе.

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

Члены комиссии:

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



И.К. Петрухина

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



Е.П. Гладунова

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



Е.Л. Абдулманова

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ЗАО «Самаралектравы»

Н.Д. Лужнов

» 2022 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Савельевой Анны Евгеньевны «Фармакогностическое исследование бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* 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 Савельевой А.Е., посвященного изучению химического состава, а также разработке методик анализа сырья бархатцев отклоненных, определению диагностических признаков и обоснованию подходов к стандартизации нового вида лекарственного растительного сырья – «Бархатцев отклоненных цветки» и лекарственного растительного препарата – «Бархатцев отклоненных цветков густой экстракт» в работе предприятия.

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

Члены комиссии:Заведующий производством
ЗАО «Самаралектравы»

А.Н. Загорянский

Главный инженер
ЗАО «Самаралектравы»

А.В. Никитенков

«Утверждаю»

Начальник ГБУЗ

«Центр контроля качества
лекарственных средств
Самарской области»

О.В. ОСИПОВА

2022 г.



АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Савельевой Анны Евгеньевны «Фармакогностическое исследование бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) в ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»

Комиссия в составе сотрудников ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»: заместителя начальника центра Жнякиной Л.Е., провизора-аналитика Черняева Н.А., провизора-аналитика Шарымова О.А., подтверждает использование материалов диссертационного исследования Савельевой А.Е., посвященного фармакогностическому исследованию бархатцев отклоненных при анализе лекарственного растительного сырья и препаратов на его основе. Разработанные методики качественного и количественного анализа апробированы в процессе работы Центра. В основе разработанных методик лежат методологические подходы, предусматривающие использование ТСХ, ВЭЖХ и УФ-спектроскопии в присутствии СО кверцетина и патулитрина. Методики определения подлинности сырья и препаратов на основе сырья цветков бархатцев отклоненных, а также методики определения суммы флавоноидов в данном виде сырья воспроизводимы и удобны в работе.

Таким образом, внедрение результатов диссертационного исследования Савельевой А.Е. будет способствовать повышению объективности стандартизации растительного сырья бархатцев отклоненных, а также лекарственных растительных препаратов на основе данного вида сырья.

Члены комиссии:

Заместитель начальника ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», кандидат фармацевтических наук

Л.Е. ЖНЯКИНА

Провизор-аналитик ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»

Н.А. ЧЕРНЯЕВА

Провизор-аналитик ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»

О.А. ШАРЫМОВА

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Самарская фармацевтическая
фабрика»

М.С. Глебов

« 24 » 09 2022 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы
Савельевой Анны Евгеньевны «Фармакогностическое исследование бархатцев
отклоненных (*Tagetes patula* L.)» на соискание ученой степени кандидата
фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия
в ООО «Самарская фармацевтическая фабрика»

Результаты диссертационной работы Савельевой А.Е. посвящены фармакогностическому исследованию бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.), разработке методик количественного определения содержания биологически активных соединений, а также обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и препаратов. В основе разработанных методик лежат методологические подходы, предусматривающие использование морфолого-анатомического анализа, ТСХ и УФ-спектроскопии, ВЭЖХ с использованием стандартных образцов. Методики определения подлинности сырья и препаратов на основе сырья бархатцев отклоненных, а также методики определения суммы флавоноидов в соцветиях и траве воспроизводимы и удобны в работе.

Таким образом, разработанные методики качественного и количественного анализа апробированы в процессе работы, внедренные результаты используются в рабочем процессе ООО «Самарская фармацевтическая фабрика» и способствуют стандартизации ЛРС на этапах приемки, производства и хранения; научному обоснованию целесообразности и объективности использования современных подходов контроля качества и стандартизации по показателям наличия основных групп биологически активных веществ (подлинности) и их количественного содержания.

Главный технолог
ООО «Самарская фармацевтическая фабрика»

Д.С. Зуев

« 24 » 09 2022 г.

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор ООО «Лекарь»

Бобров Д.Ю.

2022 г.



АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Савельевой Анны Евгеньевны «Фармакогностическое исследование бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия в ООО «Лекарь»

Результаты диссертационной работы Савельевой А.Е. посвящены фармакогностическому исследованию бархатцев отклоненных (*Tagetes patula* L.), разработке методик количественного определения содержания биологически активных соединений, а также обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья и препаратов. В основе разработанных методик лежат методологические подходы, предусматривающие использование морфолого-анатомического анализа, ТСХ и УФ-спектроскопии, ВЭЖХ с использованием стандартных образцов. Методики определения подлинности сырья и препаратов на основе сырья бархатцев отклоненных, а также методики определения суммы флавоноидов в соцветиях и траве воспроизводимы и удобны в работе.

Разработанные методики качественного и количественного анализа апробированы в процессе работы, внедренные результаты используются в рабочем процессе ООО «Лекарь» и способствуют стандартизации ЛРС на этапах приемки, производства и хранения; научному обоснованию целесообразности и объективности использования современных подходов контроля качества и стандартизации по показателям наличия основных групп биологически активных веществ (подлинности) и их количественного содержания.

Главный технолог

ООО «Лекарь»

« 21 » 05 2022 г.

Приложение 3. ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР - и масс-спектры индивидуальных соединений, выделенных из цветков бархатцев отклоненных.

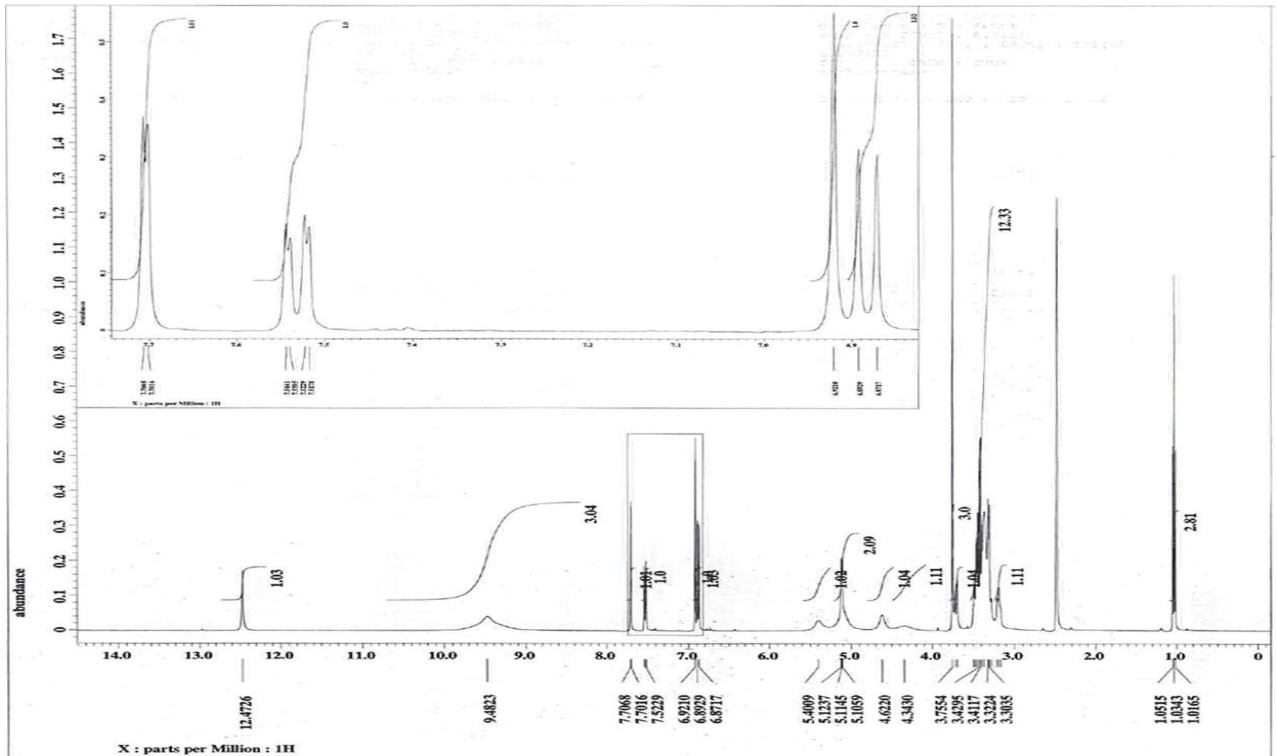


Рисунок 1 – ^1H -ЯМР-спектр патулитрина (1) в ДМСО- d_6 .

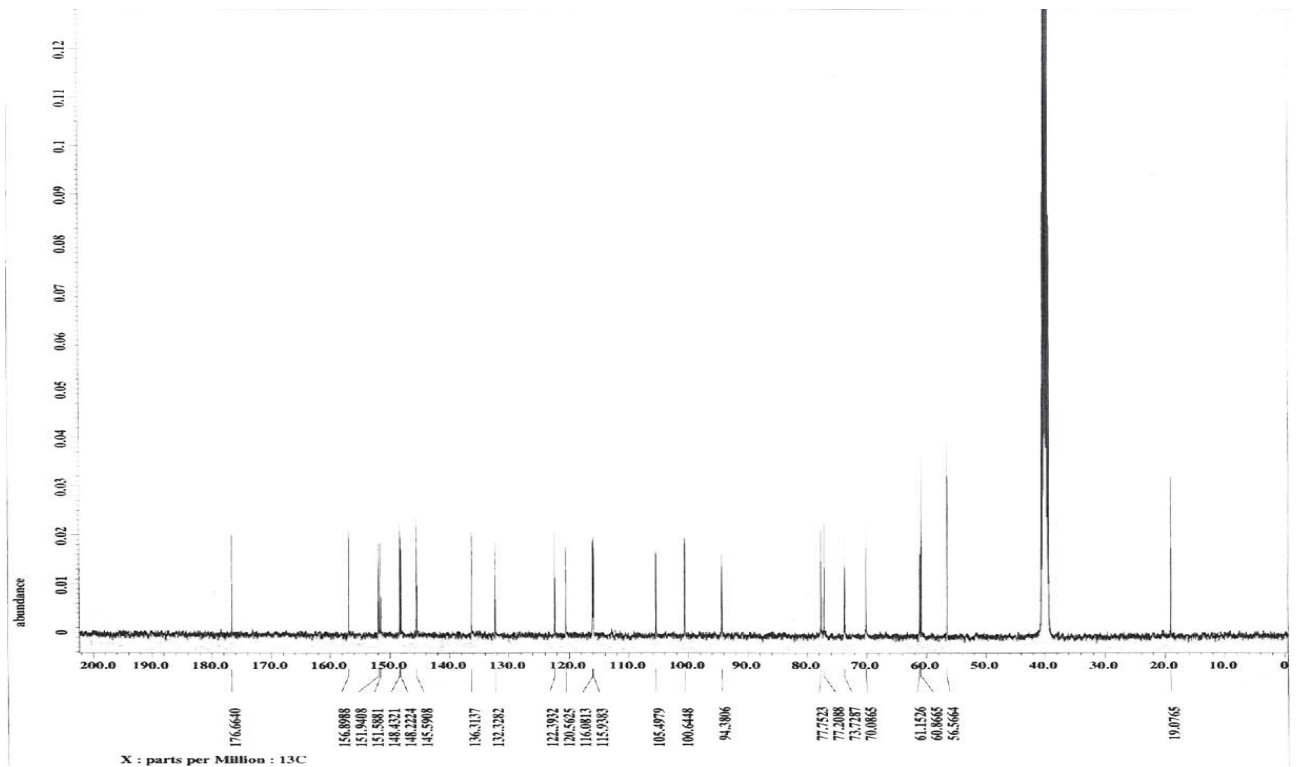


Рисунок 2 – ^{13}C -ЯМР-спектр патулитрина (1) в ДМСО- d_6 .

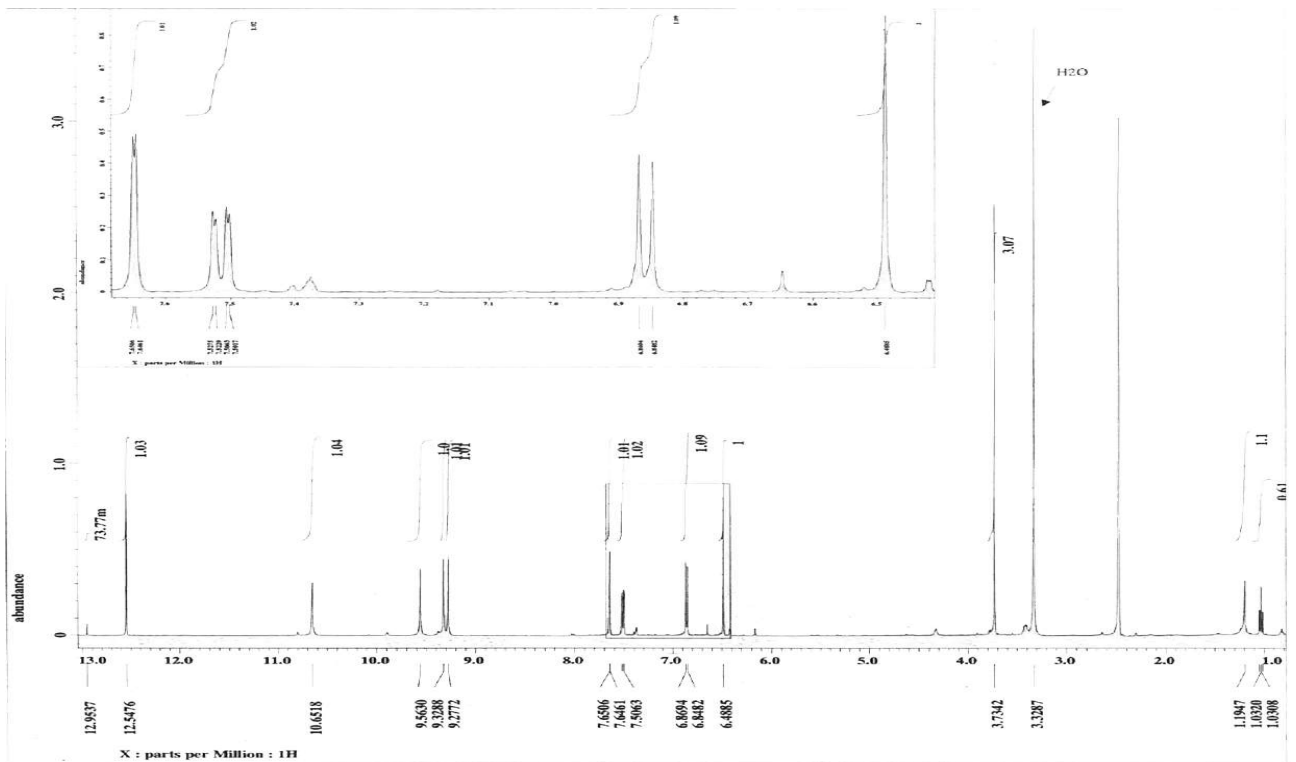


Рисунок 3 – ¹H-ЯМР-спектр патулетина (2) в ДМСО-d₆.

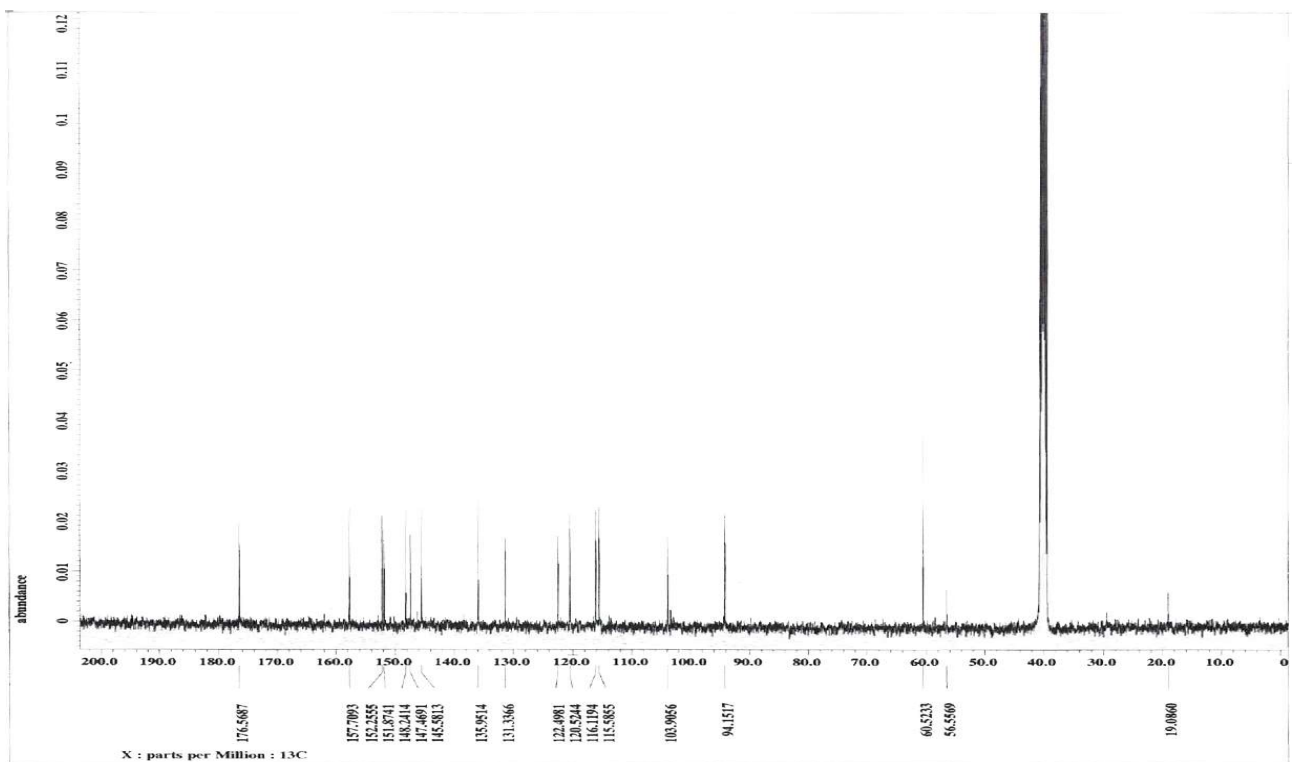


Рисунок 4 – ¹³C-ЯМР-спектр патулетина (2) в ДМСО-d₆.

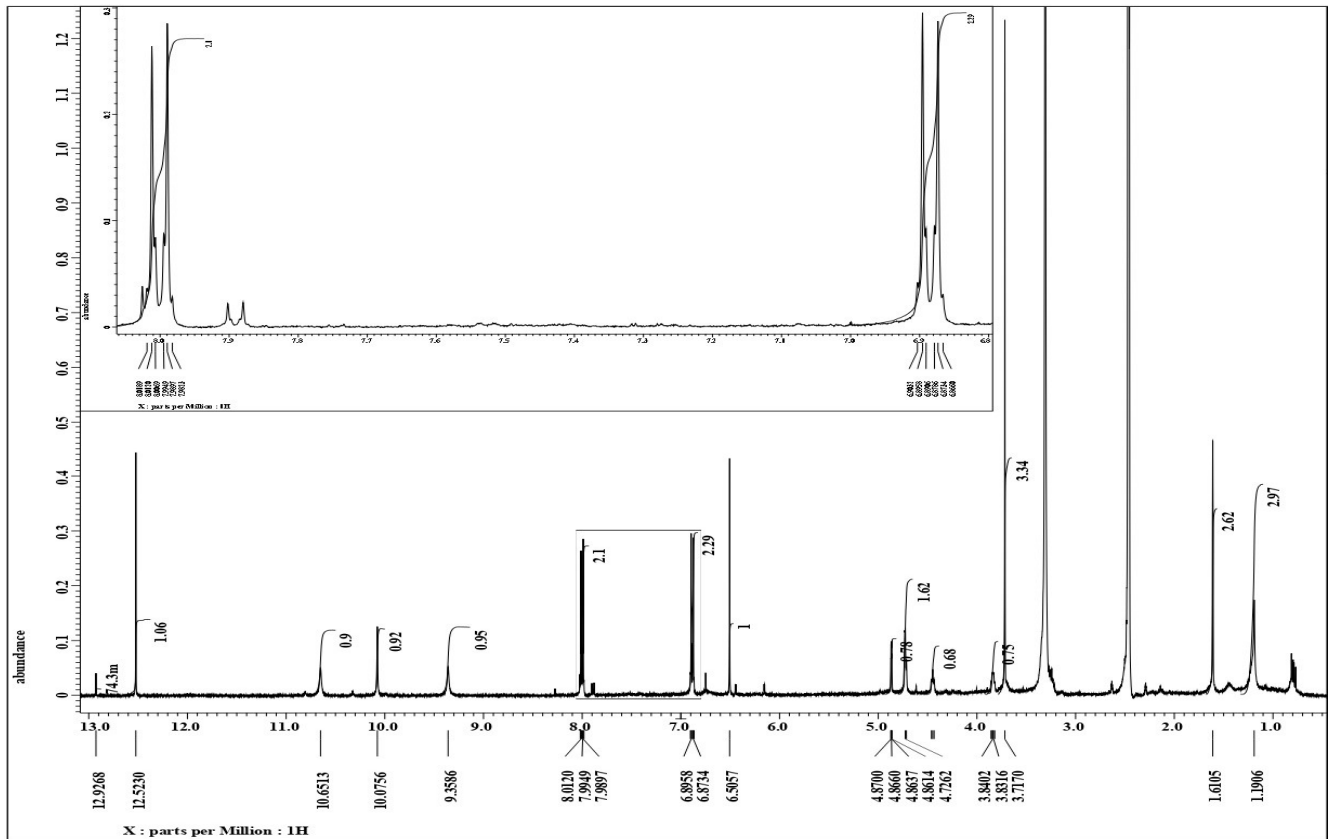


Рисунок 5 - ^1H -ЯМР-спектр 6-метоксикемпферола (**5**) в ДМСО- d_6 .

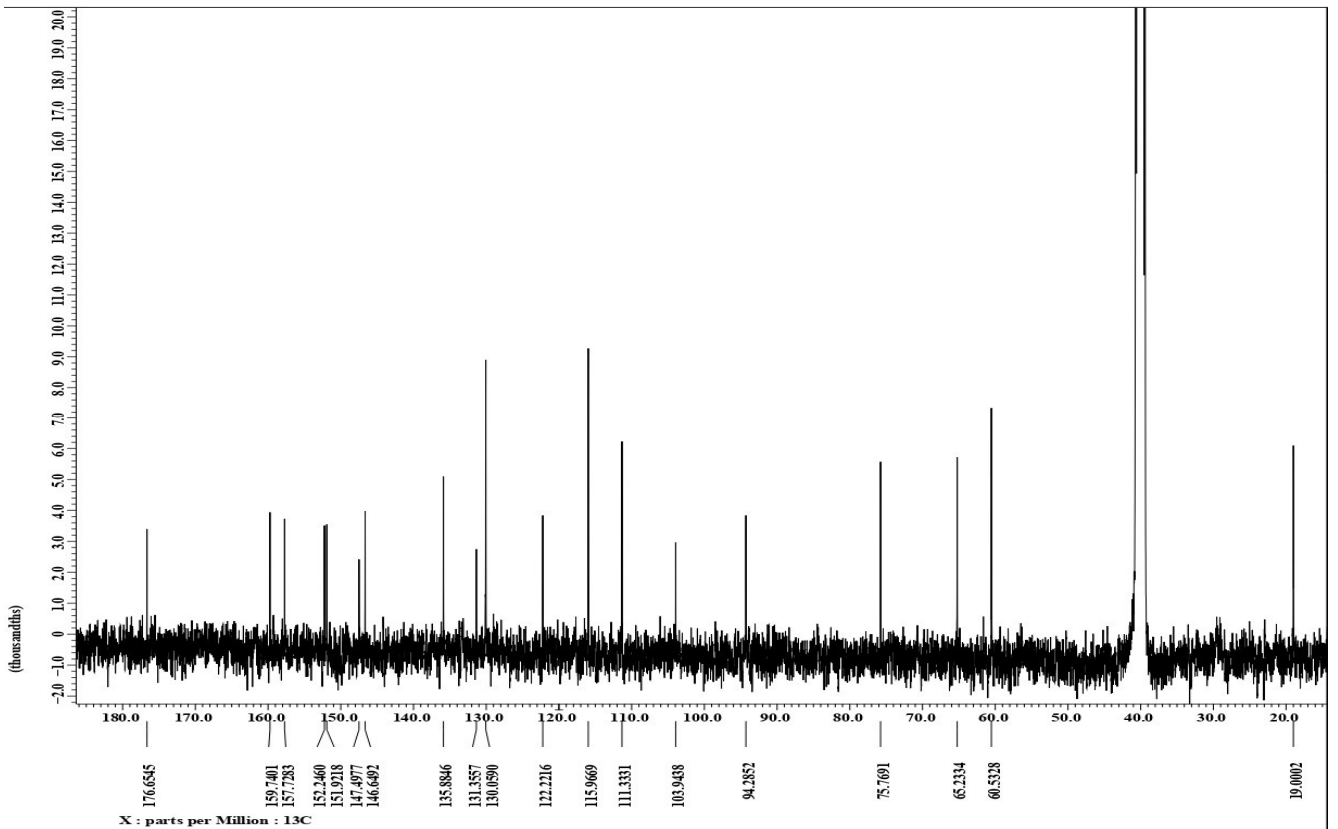


Рисунок 6 – ^{13}C -ЯМР-спектр 6-метоксикемпферола (**5**) в ДМСО- d_6 .

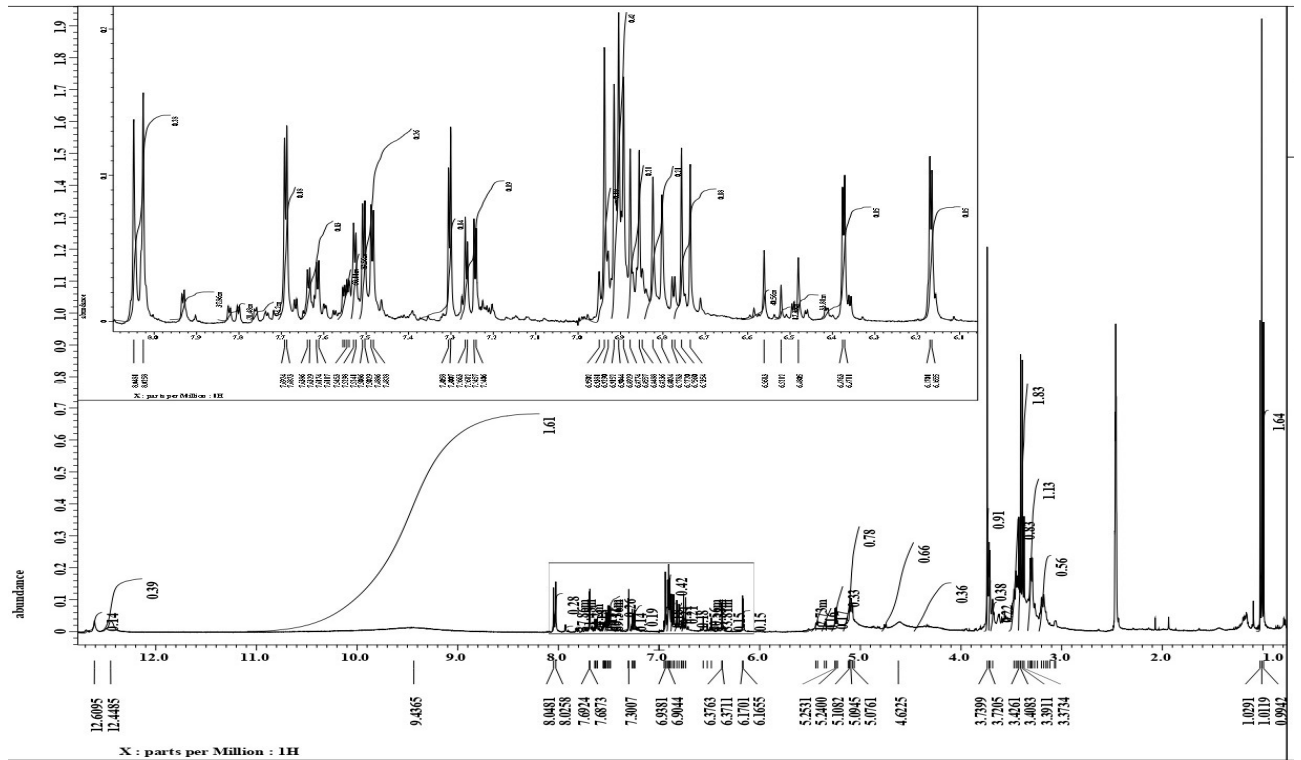


Рисунок 7 – $^1\text{H-NMR}$ -спектр 7-О- β -D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-6-метоксифлавона (**6**) в DMSO-d_6 .

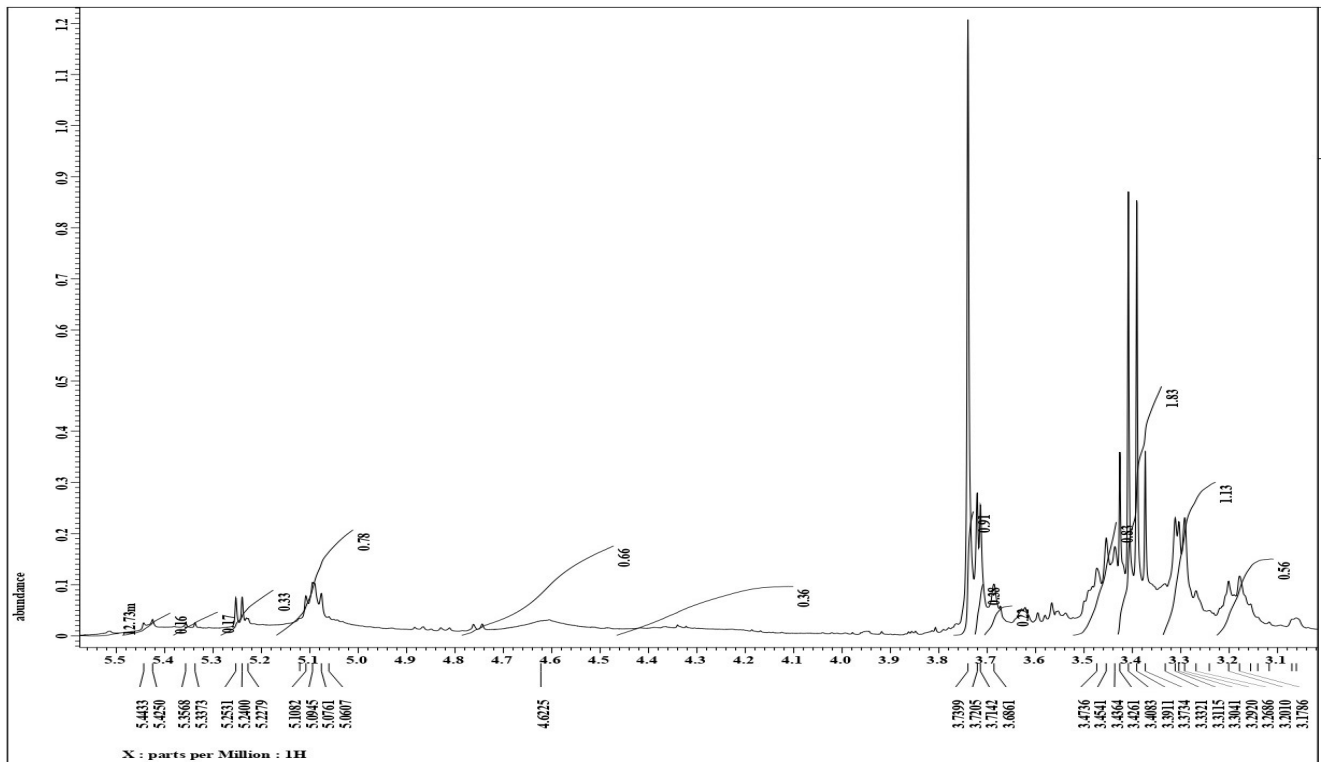


Рисунок 8 – Фрагмент $^1\text{H-NMR}$ -спектра 7-О- β -D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-6-метоксифлавона (**6**) в DMSO-d_6 .

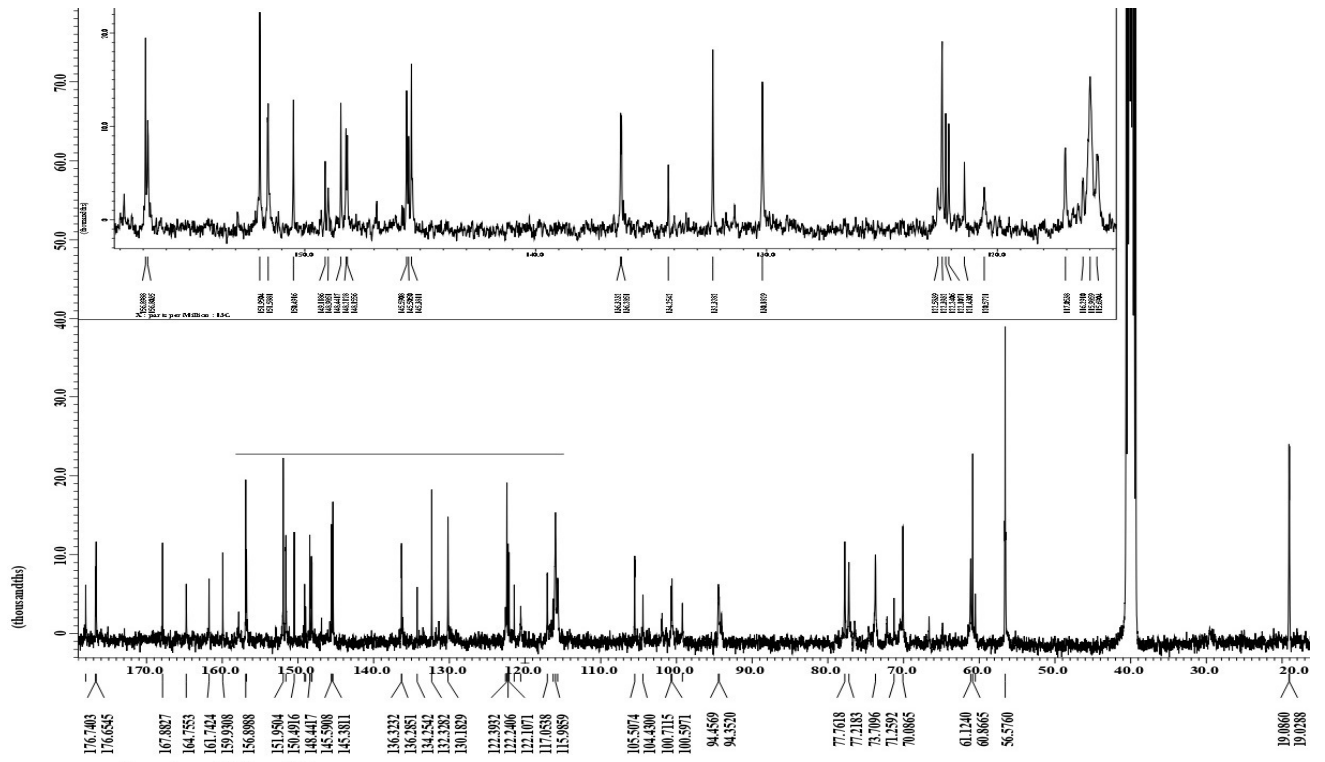


Рисунок 9 – ^{13}C -ЯМР-спектр 7-О- β -D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-6-метоксифлавона (**5**) в ДМСО- d_6 .

Display Report

Analysis Info

Analysis Name D:\Data\Chizhov\Miscellaneous\Kurkin\2\tp-13_&clblow.d
 Method tune_low_1550.m
 Sample Name /CHIZ TP-13
 Comment CH3OH 100 %, dil. 200, calibrant added

Acquisition Date 23.11.2021 17:40:45

Operator BDAL@DE

Instrument / Ser# maXis 43

Acquisition Parameter

Source Type	ESI	Ion Polarity	Positive	Set Nebulizer	0.4 Bar
Focus	Not active			Set Dry Heater	180 °C
Scan Begin	50 m/z	Set Capillary	4500 V	Set Dry Gas	4.0 l/min
Scan End	1550 m/z	Set End Plate Offset	-500 V	Set Divert Valve	Source

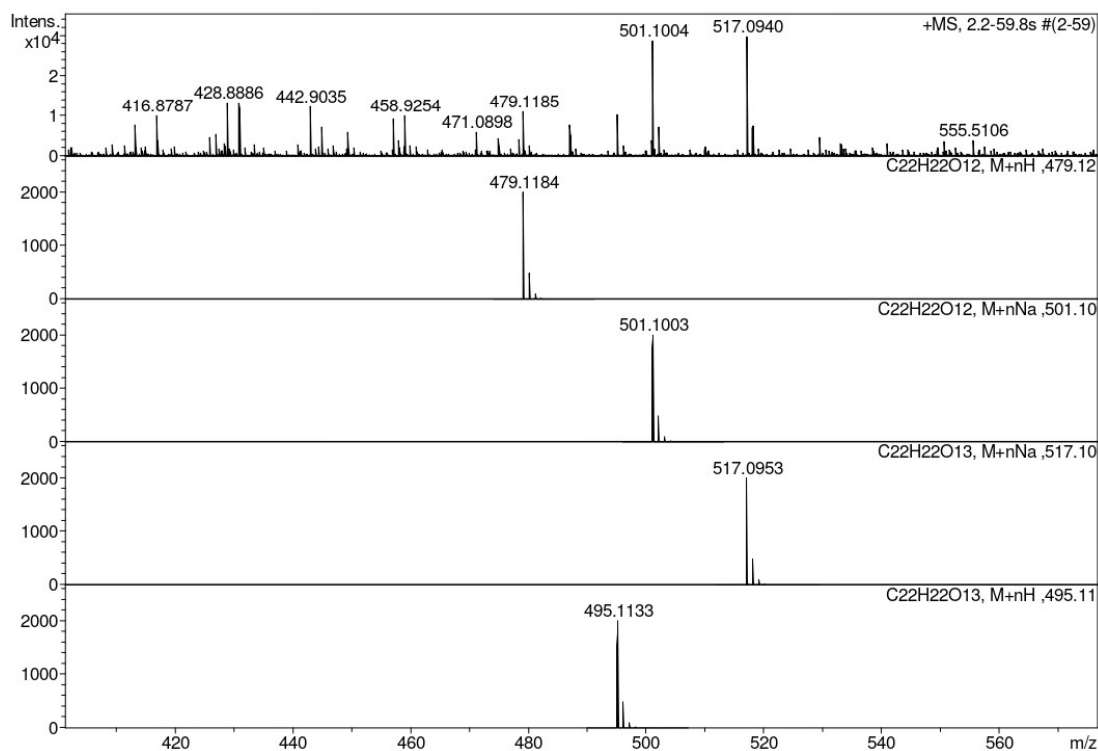
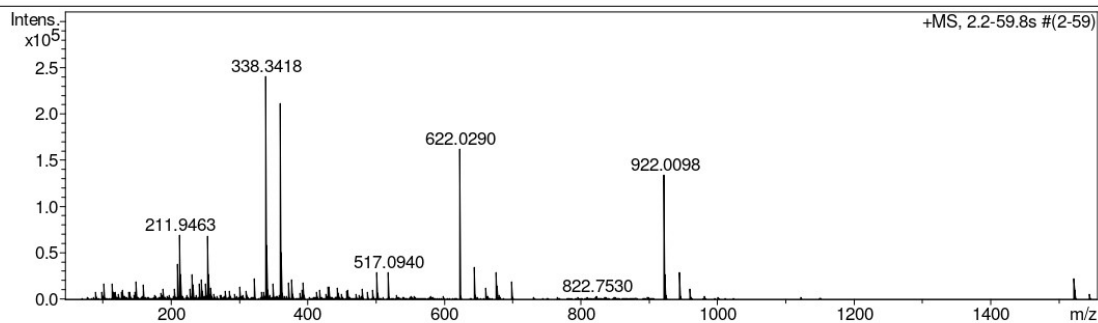


Рисунок 10 – Масс-спектр 7-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,4'-тетрагидрокси-6-метоксифлавона (5).

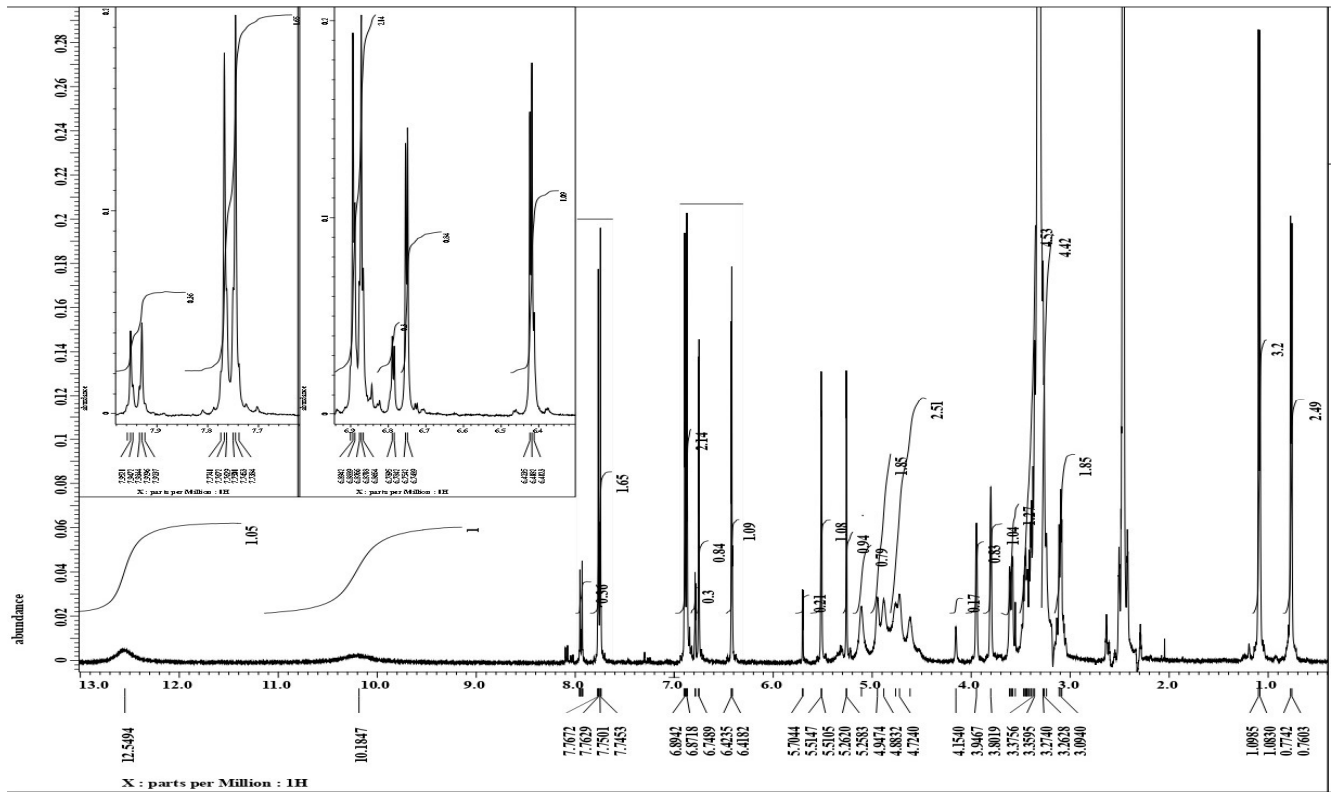


Рисунок 11 – ^1H -ЯМР-спектр 3-О- α -L-рамнопиранозида-7-О- α -L-рамнопиранозида 3,5,7,4'-тетрагидроксифлавона (7) в ДМСО- d_6 .

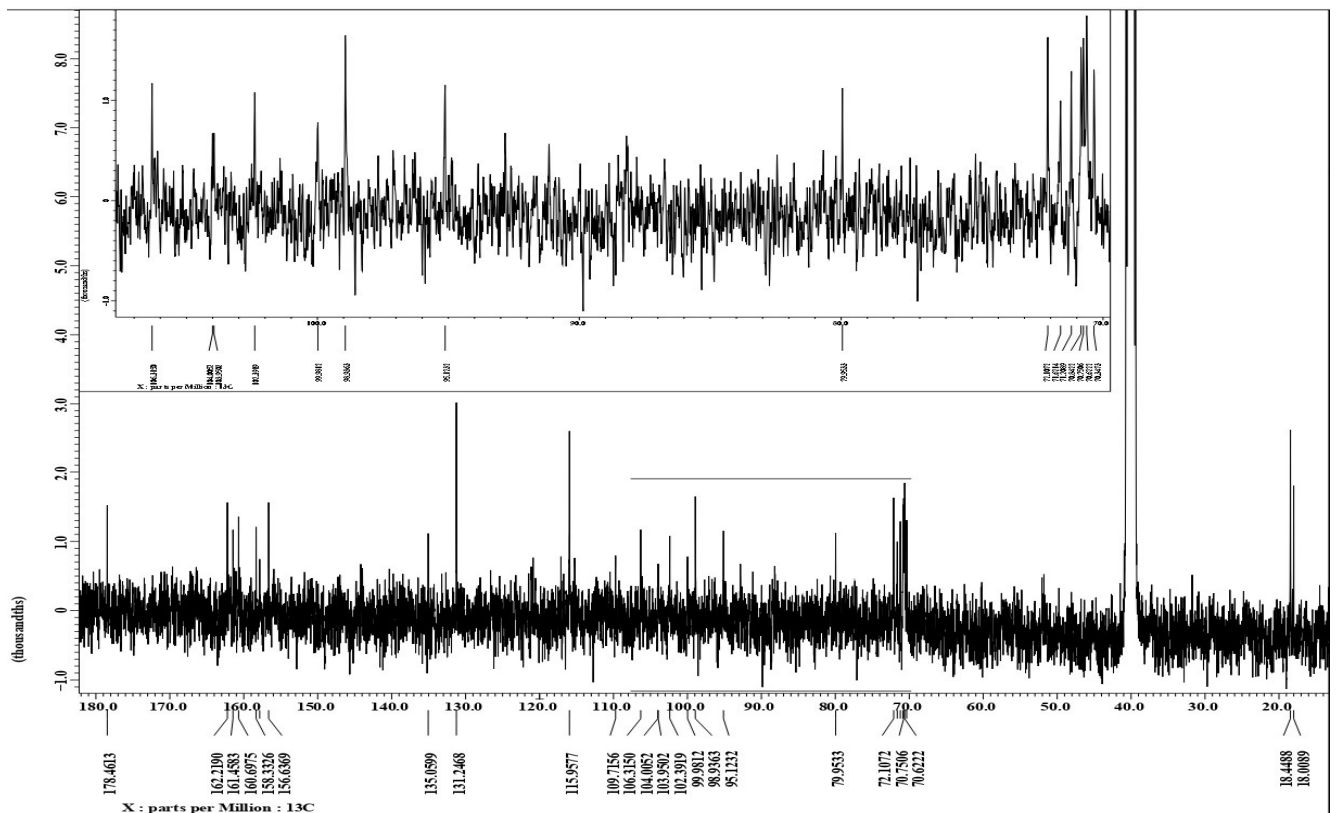


Рисунок 12 – ^{13}C -ЯМР-спектр 3-О- α -L-рамнопиранозида-7-О- α -L-рамнопиранозида 3,5,7,4'-тетрагидроксифлавона (7) в ДМСО- d_6 .

Приложение 4. 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 цветков).

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 патулитрин 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.

Приложение 5. Методика количественного определения суммы каротиноидов в соцветиях бархатцев отклоненных.

Аналитическую пробу сырья бархатцев отклоненных измельчают до размера частиц 3 мм. Около 1,0 г сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл гексана, колбу закрывают пробкой и осуществляют экстракцию при периодическом перемешивании в течение 2 часов. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр («красная полоса»). Испытуемый раствор готовят следующим образом: 2 мл гексанового извлечения переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем гексаном до метки и перемешивают.

Оптическую плотность испытуемого раствора измеряют на спектрофотометре при длине волны 450 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм.

В качестве раствора сравнения используют гексан.

Содержание β-каротина в пересчете на абсолютно сухое сырье в мг% (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D_x * 50 * 25 * 100 * 1000}{m_x * 2 * 2773 * (100 - W)}$$

где:

D_x – оптическая плотность испытуемого раствора,

m_x – навеска сырья, г,

W – влажность сырья, %,

2773 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) β-каротина при длине волны 450 нм.

Приложение 6. Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве 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.

Приложение 7. Методика количественного определения патулитрина в соцветиях бархатцев отклоненных.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до 0,01. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 45 минут. Затем колбу охлаждают в течение 30 минут, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

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 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_0 – среднее значение площади пика раствора патулитрина, вычисленное из хроматограмм раствора патулитрина;

V – объем извлечения, мл;

V_1 – объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл;

V_0 – объем раствора патулитрина, мл;

V_2 – объем вводимой пробы раствора патулитрина, мкл;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса патулитрина, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Приложение 8. Проект фармакопейной статьи на новый вид лекарственного растительного сырья «Бархатцев отклоненных цветки».

**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 СРЕДСТВА**

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

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

Бархатцев отклоненных
цветки

ФС.2.5.
Вводится впервые

Tagetis patulae flores

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

Собранные в фазу цветения и плодоношения высушенные соцветия культивируемого однолетнего травянистого растения бархатцы отклоненные – *Tagetes patula* L., сем. астровые – *Asteraceae*.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

Собранные в фазу цветения и плодоношения высушенные соцветия культивируемого однолетнего травянистого растения бархатцы отклоненные – *Tagetes patula* L., сем. астровые – *Asteraceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Внешние признаки. Сырье изучается невооруженным глазом, с помощью лупы (x10) в соответствии с разделом «Методы анализа лекарственного растительного сырья» (ГФ РФ XIV издания).

Цельное сырье. Цельные или частично осыпавшиеся корзинки диаметром до 5 см, без цветоносов или с остатками цветоносов длиной не более 3 см. Обертка серовато-зеленая, однорядная; листочки линейные, заостренные, неопушенные, на поверхности встречаются продолговатые эфиромасличные железки. Цветоложе выпуклое, ячеистое, неопушенное. Цветки двух видов – язычковые и трубчатые. Краевые цветки язычковые, длиной от 15 до 35 мм. Цветки расположены в один ряд у немахровых или несколько – у махровых форм. Срединные цветки трубчатые с пятизубчатым венчиком. Изредка встречаются недозрелые плоды.

Цвет краевых цветков желтый, оранжевый, красно-оранжевый или красно-бурые; срединных – оранжевый, красно-оранжевый или желтый; незрелых плодов – темно-коричневый или черный. Запах слабый. Вкус водного извлечения слабый, сладковато-пряный.

Измельченное сырье. Смесь кусочков цветоложа, язычковых и трубчатых цветков, листочков обертки и их фрагментов, цветоносов, изредка кусочков недозрелых плодов, проходящих сквозь сито с отверстиями 5 мм.

Микроскопические признаки. *Цельное сырье.* Сырье исследуется с помощью микроскопа (10×, 40×, 100×) в соответствии с разделом «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья» (ГФ РФ XIV издания).

Цельное, измельченное сырье.

При рассмотрении микропрепарата язычковых цветков в области отгиба венчика с абаксиальной (верхней) стороны эпидермис густо покрыт конусовидными одноклеточными волосками – папиллами. 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. Поверхность трубки венчика визуальна более светлая. Эпидермальные клетки прямоугольной формы с заметно утолщенными целлюлозными клеточными стенками. Протопласт выражен слабо. На отгибе венчика с нижней стороны характер папилловидных выростов эпидермы иной. Клетки эпидермы округлые. Мелкозернистый пигментированный протопласт менее выражен. В средней части лепестков венчика с 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.

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. Поверхность отгиба венчика значительно опушена простыми вытянутыми волосками. Клеточные стенки волосков тонкие волнистые. Протопласты волосков аналогично папиллам на отгибе язычковых цветков имеют многочисленные пигментированные капли.

С абаксиальной (нижней) стороны в области отгиба венчика опушение трихомами в основном локализовано по краю лепестков венчика. Основная поверхность отгиба венчика не опушена и покрыта тонкостенными

эпидермальными клетками овальной формы с большим количеством жирных капель красно-оранжевого цвета в протопласте.

Трубка венчика трубчатого цветка не пигментирована. Клетки эпидермы прямоугольные тонкостенные. Протопласт выражен слабо.

По поверхности околоцветника, в частности, в структуре и на поверхности тек пыльников диагностируются пыльцевые зёрна. Они имеют нативно коричнево-желтую окраску и характерную шиповатую структуру.

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.

Под эпидермисом на просвете хорошо заметны крупные светло-желтые вместилища овальной формы с жирными каплями оранжево-красной окраски, локализованные, как правило, по периферии вместилища

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.

А - Верхний эпидермис отгиба венчика язычкового цветка (увеличение $\times 400$)	Б – Трубка венчика язычкового цветка (увеличение $\times 100$)	В – Нижний эпидермис отгиба венчика язычкового цветка (увеличение на $\times 400$)
Г – Нижний эпидермис язычкового цветка, гусеницевидные волоски (увеличение $\times 400$)	Д – Верхний эпидермис отгиба венчика трубчатого цветка (увеличение $\times 400$)	Е – Верхний эпидермис отгиба венчика трубчатого цветка (увеличение $\times 100$)
Ж – Нижний эпидермис отгиба венчика трубчатого цветка (увеличение $\times 100$)	З – Эпидермис трубки венчика трубчатого цветка (увеличение $\times 40$)	И – Пыльца (увеличение $\times 400$)
К – Фрагмент обёртки с вместилищем (x400)	Л – Вместилище на поперечном сечении обёртки (x400)	М – Проводящий пучок на поперечном сечении обёртки (увеличение $\times 400$)

Рис. 1. Микроскопические признаки цветков бархатцев отклоненных

Определение основных групп биологически активных веществ:

1. УФ-спектроскопия

Испытуемый раствор, приготовленный как указано в разделе «Количественное определение» имеет максимум для дифференциальной кривой поглощения при длине волны 428 ± 2 нм (рис. 2, 3).

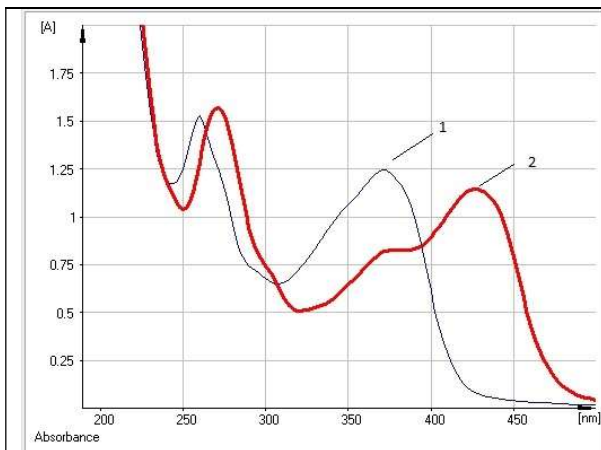


Рис. 2. Кривая поглощения УФ-спектров раствора водно-спиртового извлечения из цветков бархатцев отклоненных: 1 – исходный раствор; 2 – в присутствии $AlCl_3$

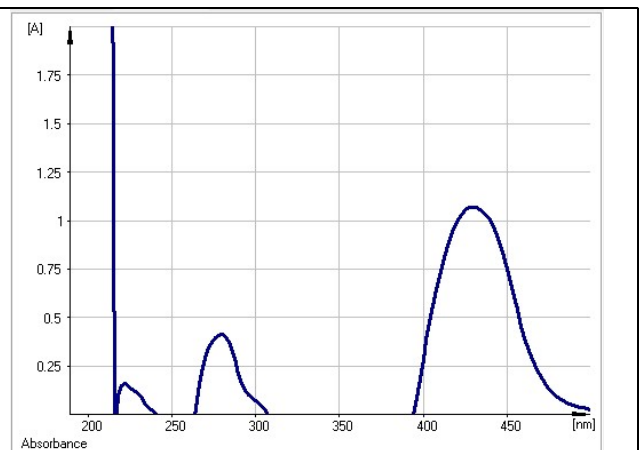


Рис. 3. Дифференциальная кривая поглощения УФ-спектров раствора водно-спиртового извлечения из цветков бархатцев отклоненных

2. Тонкослойная хроматография

Извлечение наносили на предварительно активированные хроматографические пластинки «Сорбфил-ПТСХ-АФ-Ф-УФ» или «Сорбфил-ПТСХ-П-А-УФ». На линию старта аналитической хроматографической пластики со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемого раствора и параллельно 5 мкл растворов стандартных образцов (СО) патулетина и патулитрина.

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 366 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: зона адсорбции с желтой или коричнево-желтой флуоресценцией на уровне адсорбции СО патулетина, зона адсорбции с желтой или коричнево-желтой флуоресценцией на уровне адсорбции СО патулетина. Допускается наличие других пятен меньшей интенсивности свечения.

Приготовление раствора стандартного образца патулетина: Около 0,005 г патулетина растворяют в 10 мл спирта 96% и перемешивают (раствор стандартного образца патулетина).

Приготовление раствора стандартного образца патулитрина: Около 0,005 г патулитрина растворяют в 10 мл спирта 96% и перемешивают (раствор стандартного образца патулитрина).

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 14%.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 12%.

Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 5 %.

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

Посторонние примеси.

Остатки цветоносов, в том числе отделенные от корзинок при анализе.

Цельное сырье – не более 6%.

Корзинки с полностью осыпавшимися язычковыми и трубчатыми цветками (цветоложе с обертками). Цельное сырье – не более 20 %.

Частей сырья, утративших естественную окраску. Цельное сырье – не более 2 %.

Другие части растения (кусочки стеблей, листьев). Цельное сырье, измельченное сырье – не более 3 %.

Органическая примесь. Цельное сырье – не более 0,5%.

Минеральная примесь. Цельное сырье – не более 0,5 %.

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 патулитрин не менее 4,0 %.

Сумма флавоноидов.

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 тарирных 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 (извлечение из цветков).

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).

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:

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

где:

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, г;

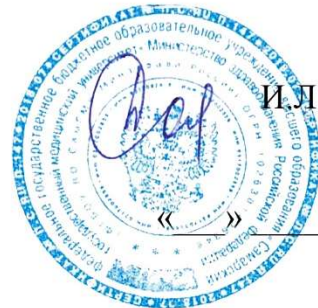
320 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) стандартного образца патулитрина при 428 нм;

W – потеря в массе при высушивании в процентах.

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

«__» _____ 2022

Заведующий кафедрой фармацевтической технологии с курсом биотехнологий ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, доктор фармацевтических наук, доцент

А.В. Куркина

«__» _____ 2022

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

А.Е. Савельева

«__» _____ 2022