

КАЛАШНИКОВА ОЛЬГА АЛЕКСАНДРОВНА

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ЦЕФАЛЯРИИ ГИГАНТСКОЙ
(*CERHALARIA GIGANTEA* (LEDEB.) BOBROV)**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

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

Научный руководитель:

кандидат фармацевтических наук, доцент **Рыжов Виталий Михайлович**

Официальные оппоненты:

Ханина Миниса Абдуллаевна – доктор фармацевтических наук, профессор, государственное образовательное учреждение высшего образования Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет», кафедра фармацевтической химии и фармакогнозии, заведующий кафедрой.

Белоусов Михаил Валерьевич – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармацевтического анализа, заведующий кафедрой.

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

Защита состоится « ____ » _____ 2024 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.061.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке по адресу: 443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171 и на сайте (<http://www.samsmu.ru/scientists/science/referats/2024/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук, доцент

Жданова Алина Валитовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Современные фитопрепараты представляют особый интерес, так как сочетают в себе широкий спектр биологической активности и относительную безопасность. Одной из важнейших задач, стоящих перед фармацевтической отраслью и промышленностью России, является разработка собственных инновационных и безопасных препаратов и фармацевтических веществ. Это политически важное направление в отечественной науке анонсировано Приказом Министерства здравоохранения Российской Федерации № 66 от 13 февраля 2013 года (в редакции от 13 июля 2021 года) «Об утверждении Стратегии лекарственного обеспечения населения Российской Федерации на период до 2025 года и плана ее реализации» и постановлением Правительства Российской Федерации № 2544 от 29 декабря 2021 года «О внесении изменений в государственную программу РФ «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности».

Флора Российской Федерации насчитывает более 10 тысяч видов растений, которые традиционно использовались в народной медицине. Однако Государственный реестр лекарственных средств России подтвердил эффективность всего около 350 растений. Поэтому становится необходимым проверить народный опыт использования других видов растений и расширить список лекарственных растений, чтобы внедрить их в официальную медицину.

Опираясь на данные научной периодики и собственных исследований очевидно, что цефалария гигантская (*Cephalaria gigantea* (LEDEB.) Bobr.) семейства Ворсянковые (*Dipsacaceae*) перспективный источник биологически активных соединений (БАС), которые в свою очередь могут извлекаться из различных морфологических частей данного растения и являться сырьевыми частями. Цефалария гигантская широко распространена во флоре Центральной России, имеет значительную сырьевую базу, что обуславливает экономическую эффективность и целесообразность. Данный вид применяется в народной медицине в качестве антимикробного, противогрибкового, антиоксидантного, цитотоксического и противосудорожного средства (Дрозд Г.А., 2006, Киселева Т.Л., 2009, Корсун В.Ф., 2007). Химический состав растения практически не изучен, также не имеется экспериментальных данных о его фармакологической активности, которые могли бы послужить основой для его исследования.

Таким образом, проведение фармакогностического анализа растительного сырья цефаларии гигантской представляется актуальным с точки зрения изучения возможностей и перспективы применения как официального лекарственного растительного сырья (ЛРС) для получения лекарственных препаратов (ЛП) и лекарственных средств (ЛС) с противомикробной и диуретической активностью.

Степень разработанности темы. Морфологические характеристики и данные о фармакологической активности листьев и цветков цефаларии гигантской описаны наиболее подробно. Фенольные соединения являются главными группами БАС, обеспечивающих фармакологические свойства данного растения. Результаты исследований зарубежных ученых указывают на значительный потенциал использования цефаларии гигантской в фармацевтической и парафармацевтической отраслях (Nasri H., 2015, Nazli B., 2014, Tabatadze N., 2020, Top H., 2012, Zemtsova G., 1968).

Изложенная информация показывает значимость исследования содержания и ассортимента химических соединений, оценки качества нового вида ЛРС цефаларии гигантской и анализа возможностей разработки ЛС на его основе.

Цель и задачи исследования:

Цель исследования заключается в научном обосновании применения цветков и листьев цефаларии гигантской в медицинских целях и разработке методов стандартизации новых видов растительного сырья данного растения.

Процесс достижения конечного результата целеполагания требовал решения ряда задач:

1. Изучить современные данные научной периодики по вопросам применения и исследования цефаларии гигантской (*Cephalaria gigantea* (LEDEB.) Vobr.) в мировой практике.

2. Изучить морфолого-анатомическое строение основных морфологических органов цефаларии гигантской (листьев, стеблей, цветков) и выявить селективные таксономические признаки, для конкретного вида – цефалария гигантская.

3. Провести сравнительное фитохимическое исследование основных морфологических органов цефаларии гигантской (листьев, стеблей, цветков), выявить ассортиментное и процентное содержание биологически активных веществ, обуславливающих основной фармакологический эффект.

4. Разработать методики качественного анализа перспективного сырья цефаларии гигантской.

5. Разработать методики количественного анализа перспективного сырья цефаларии гигантской.

6. Провести исследование фармакологической активности извлечений и субстанций на основе листьев и цветков цефаларии гигантской.

7. Разработать проекты нормативных документов, регламентирующих качество нового лекарственного растительного сырья «Цефаларии гигантской листья» и «Цефаларии гигантской цветки» - фармакопейных статей (ФС).

Научная новизна. Впервые проведены морфолого-анатомическое и анатомо-гистологическое исследования листьев, стеблей и цветков цефаларии гигантской (*Cephalaria gigantea* (LEDEB.) Vobr.). В качестве диагностически значимых признаков листа отмечены: железистые трихомы вместе с двухрядной головкой; кроющие простые одноклеточные волоски с возвышением, а также розеткой клеток в основании, а кроме того их бородавчатой кутикулой; углубленность анамоцитных устьичных аппаратов в стеблях касательно эпидермы; амфистоматический тип дорзовентрального листка; волнообразная извилистость клеточных стенок эпидермы с нижней стороны листовой пластинки; четко выраженную утолщенность клеточных стен эпидермиса на верхней поверхности листовой пластинки. Важные особенности строения цветков: сосочковидные выросты по краю отгиба венчика, кроющие одноклеточные трихомы, структура гинецея вместе с продолговатым рыльцем и пигментированными клетками эпидермы по краю рыльца, структура пыльцевых зерен треугольной формы с выростами на месте апертур, люминесценция вегетативной клетки пыльцевого зерна в виде узкого треугольника при экспозиции в световом диапазоне с длиной волны (λ) 420 нм.

Впервые из листьев цефаларии гигантской выделены: космосин (7-*O*- β -*O*-глюкопиранозид апигенина), изоориентин (6-*C*- β -*D*-глюкопиранозид 5,7,3',4'-

тетрагидроксифлавона), из цветков – гигантозид В (7-*O*-[(6''-*O*- β -D-ксилопиранозил)]- β -D-глюкопиранозида 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона), причём данное вещество ранее не встречалось в научной литературе.

Впервые разработаны методики качественного и количественного анализа биологически активных соединений в листьях цефаларии гигантской (в пересчете на цинарозид) и цветках (в пересчете на кверцетин) с применением тонкослойной хроматографии (ТСХ) и дифференциальной спектрофотометрии. Впервые разработана методика количественного определения гигантозида В в цветках цефаларии гигантской с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Впервые проведено исследование антимикробной и противогрибковой активности извлечений из листьев и цветков цефаларии гигантской в отношении *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Candida albicans* (клинический штамм), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Bacillus cereus* (клинический штамм).

Впервые проведено исследование острой токсичности сухого экстракта листьев и цветков цефаларии гигантской, подтвердившее безопасность сухого экстракта для дальнейших исследований с возможным применением в медицинской практике.

Теоретическая и практическая значимость. Значимость настоящего диссертационного исследования заключается в дополнении существующих знаний о цефаларии гигантской как о перспективном лекарственном растении. Используя современные подходы к стандартизации РС, нами были разработаны методики качественного и количественного анализа флавоноидов в листьях и цветках цефаларии гигантской с применением методов ТСХ, ВЭЖХ и УФ-спектрофотометрии. Значимость данного отрывка исследования закреплена результатом интеллектуальной собственности – патентом Российской Федерации на изобретение №2807831 от 21.11.2023 г. «Способ количественного определения суммы флавоноидов в листьях цефаларии гигантской».

Выявлены, апробированы и установлены показатели количественных характеристик качества листьев и цветков цефаларии гигантской, а именно содержание суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид - не менее 3,0 % и на кверцетин – не менее 2,0 % соответственно. Изучен компонентный состав листьев и цветков цефаларии гигантской. Разработан раздел «Микроскопия», введенный в последствии в проекты нормативного документа (ФС) на новые ЛРС «Цефаларии гигантской листья» и «Цефаларии гигантской цветки». Обосновано использование ЛРС цефаларии гигантской в фармацевтической и парафармацевтической практике.

Анализ противогрибковой активности водных извлечений изучаемых органов цефаларии гигантской позволил выявить наличие значительной активности в отношении грибов *Candida albicans*: из листьев при двукратном разведении. Исследование противомикробной активности водно-спиртовых извлечений показало, что сумма веществ, извлекаемых спиртами концентраций 40% и 70% оказывает противомикробную активность как в отношении грамположительных бактерий *S.aureus*, *B.cereus* так и грамотрицательных *P.aeruginosa* и *E.coli*. При этом наибольшая активность в отношении указанных штаммов проявлена извлечениями на основе 70 % спирта.

Изучена диуретическая активность индивидуального вещества – цинарозида и сухих экстрактов из листьев и цветков цефаларии гигантской. Результаты эксперимента и их анализ позволили заключить, что в 24-х часовом эксперименте при однократном внутривенном введении цинарозида в дозе 5 мг/кг у животных опытной группы

относительно показателей водного контроля отмечалось достоверное повышение диуреза (на 19%). При однократном внутривенном введении СЭ цефаларии листьев в дозе 10 мг/кг не наблюдалось существенных изменений диуреза в экспериментальной группе животных за 4 и 24 ч эксперимента, однако отмечалось значительное возрастание креатининуризы у опытных животных за 24 ч опыта (на 41%) по сравнению с показателями водного контроля.

Проверена острая токсичность сухих экстрактов листьев и цветков цефаларии гигантской, для которых установлен IV класс токсичности (малоопасные вещества).

Внедрение результатов исследования. Результаты настоящего диссертационного исследования интегрированы в научный процесс и внедрены в учебно-методический комплекс структурных подразделений Института фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России; в рабочих процессах Средневолжского филиала Всероссийского НИИ лекарственных и ароматических растений ГУ «ВИЛАР», ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области», научно-образовательного центра «Фармация» апробированы и используются методики анализа растительного сырья из цефаларии гигантской, что подтверждено актами внедрения.

Связь темы исследований с планом научно-исследовательских работ. Диссертационное исследование проведено в соответствии с комплексной темой НИОКТР тематического плана ФГБОУ ВО СамГМУ Министерства здравоохранения Российской Федерации № АААА-А19-119051490148-7 от 14.05.2019 г. «Химико-фармацевтические, биотехнологические, фармакологические и организационно-экономические исследования по разработке, анализу и применению фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов».

Методология и методы исследования. Системный анализ и консолидация открытых литературных данных научной периодики, отечественных и зарубежных источников являлся основной методологической формулой настоящего диссертационного исследования. В ходе настоящего исследования осуществлялась оценка степени интереса научной общественности к изучаемому объекту исследования, определялась цель работы и промежуточные точки её достижения, проводились эксперименты по комплексному фармакогностическому изучению цефаларии гигантской (*Cephalaria gigantea* (LEDEB.) Vobr.).

Объектами исследований служили листья и цветки цефаларии гигантской, интродуцированной и выращенной в ботаническом саду Самарского государственного университета и заготовленные в разные вегетационные периоды 2021-2023 гг.

Морфолого-анатомическое исследование листьев и цветков цефаларии гигантской проводили с применением методов световой микроскопии в проходящем и отраженном свете. Кроме того, в ряде случаев использовалась поляризационная и люминесцентная микроскопия. Исследование химического состава проводили посредством тонкослойной, препаративной и высокоэффективной хроматографии, УФ- и ЯМР-спектроскопии, а также масс-спектрометрии. При анализе образцов также проводились аналитические пробы посредством пробирочных и гистохимических реакций.

Проведение статистического анализа результатов экспериментов было осуществлено согласно последнему изданию государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ) XV издания, а также с использованием программного обеспечения (STATISTICA 10.0 и ChemMetr 1.0).

Положения, выдвигаемые на защиту:

1. Актуальность применения цефаларии гигантской.
2. Результаты морфолого-анатомического изучения листьев, стеблей и цветков цефаларии гигантской.
3. Данные по химическому составу листьев и цветков цефаларии гигантской, выделенные способом препаративной колоночной хроматографии.
4. Методики качественного анализа листьев и цветков цефаларии гигантской с применением методов качественных химических реакций, ТСХ-анализа, спектрофотометрии и ВЭЖХ.
5. Методика количественного определения содержания суммы флавоноидов в листьях и цветках цефаларии гигантской методом дифференциальной спектрофотометрии, а также индивидуальных компонентов методом ВЭЖХ.
6. Результаты исследования антимикробной, противогрибковой и диуретической активности, а также острой токсичности водно-спиртовых извлечений из листьев и цветков цефаларии гигантской.
7. Внедрение проектов ФС на новые виды ЛРС «Цефаларии гигантской листья» и «Цефаларии гигантской цветки».

Степень достоверности. Достоверность результатов экспериментов в диссертационном исследовании опирается на качество и размер выборки, а также валидности методов исследований, применяемых в настоящей работе. Достоверность исследований морфолого-анатомического направления подкреплялась экспертным мнением специалистов кафедры фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии СамГМУ. Достоверность исследований по хроматографии (тонкослойная, колоночная и высокоэффективная жидкостная), и спектральным методам анализа (включая УФ- и ЯМР-спектроскопию, масс-спектрометрию) подкрепляются сертифицированными приборами, использованными в эксперименте. Полученные данные были подвергнуты статистической обработке, что дополнительно подтверждает их достоверность.

Личный вклад автора. Автор настоящего диссертационного исследования непосредственно принимал участие на всех этапах исследования. Результаты, представленные в настоящей работе получены и проанализированы автором лично. Проведен анатомо-морфологический анализ сырья цефаларии гигантской (*Cephalaria gigantea* (LEDEB.) Vobr.), выявлены отличительные диагностические признаки для исследуемого вида сырья. Проведены фармакологические и фитохимические исследования. Личное участие в диссертационном исследовании подтверждается тем, что автор выступает основным разработчиком нормативной документации на ЛРС «Цефаларии гигантской листья» и «Цефаларии гигантской цветки».

Соответствие диссертационной работы паспорту научной специальности. Основные положения, представленные в тексте диссертационной работы, полностью соответствуют пунктам 3 и 6 паспорта научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

Публикации. Основные результаты диссертационного исследования представлены в 10 печатных публикациях, в том числе 2 статьи – в журналах, включенных ВАК в перечень рецензируемых научных изданий, из них 2 статьи в журналах, включенных в МБД и индексируемых в международной базе Scopus. Получен патент РФ на изобретение № 2807831 от 21.11.2023 г.

Апробация работы. Основные материалы диссертационной работы были доложены и обсуждены на научных конференциях различных уровней, таких как: Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Аспирантские чтения: молодые ученые – медицине» 2021 г., 2022 г. (г. Самара), Научно-практическая онлайн-конференция с международным участием, посвященная 50-летию фармацевтического образования СамГМУ «Современные проблемы фармакогнозии» (г. Самара, 2021 г.), II Межвузовская научно-практическая конференция с международным участием «Синтез наук как основа развития медицинских знаний» (г. Самара, 2021 г.), Научно-практическая онлайн-конференция с международным участием, посвященная 50-летию фармацевтического образования СамГМУ «Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы» (г. Самара, 2021 г.), Научно-практическая конференция «Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы», посвященная 50-летию фармацевтического образования СамГМУ» (г. Самара, 2022 г.), Научно-практическая конференция студентов и молодых ученых «Фундаментальная наука в современной медицине» (г. Минск, 2022 г.), Научно-практическая конференция «Гаммермановские чтения» (г. Пермь, 2023 г.), II Научно-практическая конференция с международным участием «Современные проблемы Фармации» (г. Самара, 2023 г.).

Объем и структура работы. Объем диссертации изложен на 172 страницах машинописного текста. Рукопись диссертационного исследования содержит в своей структуре 70 иллюстраций, а также 26 таблиц. Структура диссертационной рукописи имеет классический формат и содержит введение, обзор литературы, главу, посвященную объектам исследования методам экспериментальной части и четыре главы с описаниями основных результатов экспериментов, а также заключение и список литературы, включающего 141 источник, из которых 40 - на иностранных языках. В конце диссертации после списка литературы приведены 4 приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектами диссертационного исследования служили образцы листьев, стеблей и цветков цефаларии гигантской (*Cephalaria gigantea* (LEDEB.) Bobrov), культивируемой на территории ботанического сада Самарского университета с 2021 по 2023 гг.

Также исследованы водно-спиртовые извлечения (на 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 % спирте этиловом в соотношении 1:50) из сырья и экстракционные препараты (настойка из листьев и из цветков цефаларии гигантской в соотношении 1:5 на 70% спирте этиловом), а также индивидуальные соединения: цинарозид (7-О-β-D-глюкопиранозид лютеолина), космосин (7-О-β-О-глюкопиранозид апигенина), изоориентин (6-С-β-D-глюкопиранозид 5,7,3',4'-тетрагидроксифлавона), кверцимеритрин (7-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона), гигантозид В (7-О-β-D-глюкопиранозид-7-О-β-D-ксилопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона).

Морфолого-анатомический анализ растительного сырья проводили с использованием цифровых микроскопов марки Motic DM-39C-N9GO (×20, ×40), ZEISS Primo Star и люминесцентного микроскопа «Альтами» ЛЮМ-2 (голубой и желтый светофильтры) с увеличениями ×40, ×100, ×400.

Изучение фитохимического состава листьев и цветков цефаларии гигантской проводилось методом жидкостной адсорбционной хроматографии с использованием

силикагеля марки КСК L 50/100 мкм (Россия) и полиамида для колоночной хроматографии (Германия). Идентификацию выделенных соединений проводили на основании данных ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР- и УФ-спектроскопии и масс-спектрометрии. Спектральные характеристики выделенных веществ определяли путем регистрации ^1H -ЯМР и ^{13}C -ЯМР спектров на приборе «JNM-ECX 400» (399,78 и 100,52 МГц, соответственно). Масс-спектры высокого разрешения были сняты на приборе «Bruker micrOTOF II» методом электрораспылительной ионизации (ESI). Регистрацию электронных спектров проводили с помощью спектрофотометра «Specord 40» (Analytik Jena AG, Германия) в диапазоне длин волн 190–600 нм в кюветках с толщиной слоя 10 мм. На различные группы БАС проводились пробирочные реакции (с раствором железа (III) хлорида, раствором алюминия (III) хлорида, раствором диазобензолсульфо кислоты, цианидиновая реакция, реакция Вильсона, реакции кислотного и ферментативного гидролиза). Для исследования извлечений из сырья и выделенных веществ методом ТСХ-анализа использовали пластинки «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» (Россия).

Антимикробная и противогрибковая активность извлечений (40%, 70%, 96% спирт) и полученной настойки (70% спирт) из листьев и цветков цефаларии гигантской была оценена с использованием штаммов *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Bacillus cereus* (ATCC 24538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), а также *Candida albicans* (клинический штамм). Определялась минимальная ингибирующая концентрация методом двойных серийных разведений в бульоне Мюллера-Хинтона. Исследование безопасности разработанного лабораторного образца настойки цефаларии гигантской проводилось путем определения острой токсичности.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Морфолого-анатомическое исследование листьев и цветков цефаларии гигантской

В результате проведенного морфолого-анатомического исследования были выявлены особенности строения листа: железистые трихомы с двухрядной головкой, кроющие простые одноклеточные волоски с возвышением и розеткой клеток в основании, а также их бородавчатой кутикулой, погруженность анамоцитных устьичных аппаратов на стеблях относительно эпидермы, амфистоматический тип дорзовентрального листа, волнистая извилистость клеточных стенок эпидермы с нижней стороны листовой пластинки, четковидная утолщенность клеточных стенок эпидермы с верхней стороны листовой пластинки, а также особенности петиолярной анатомии.

Установлены особенности строения цветков: сосочковидные выросты по краю отгиба венчика, кроющие одноклеточные трихомы, структура гинецея с продолговатым рыльцем и пигментированными клетками эпидермы по краю рыльца, структура пыльцевых зерен треугольной формы с выростами на месте апертур, люминесценция вегетативной клетки пыльцевого зерна в виде узкого треугольника при облучении светом с $\lambda = 420$ нм (рис. 1).

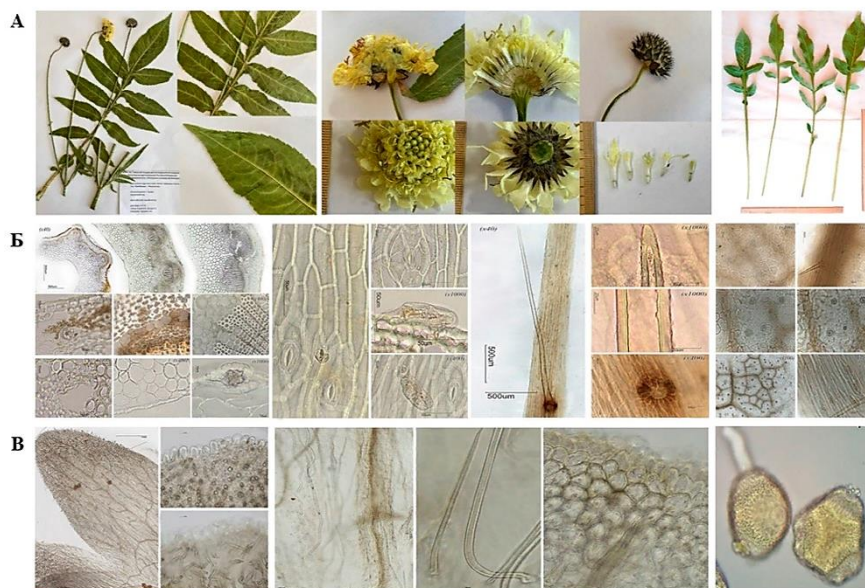


Рисунок 1 – Морфолого-анатомическое исследование цефаларии гигантской: А – морфология цефаларии гигантской; Б – анатомическое строение стебля и листа цефаларии гигантской; В – анатомическое строение цветка и пыльцы цефаларии гигантской.

2. Исследование химического состава листьев и цветков цефаларии гигантской

Из листьев цефаларии гигантской выделены: цинарозид (7-О-β-D-глюкопиранозид лутеолина), космосин (7-О-β-О-глюкопиранозид апигенина), изоориентин (6-С-β-D-глюкопиранозид 5,7,3',4'-тетрагидроксифлавона). Из цветков цефаларии гигантской, культивируемой в Российской Федерации, выделены: кверцимеритрин (7-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона), гигантозид В (7-О-β-D-глюкопиранозид-7-О-β-D-ксилопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона), который является новым природным соединением (рис. 2 и 3).

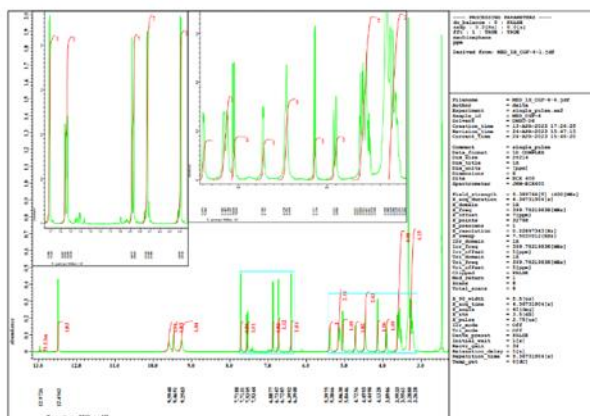


Рисунок 2 – ¹H-ЯМР-спектр в DMSO-d₆ гигантозида В

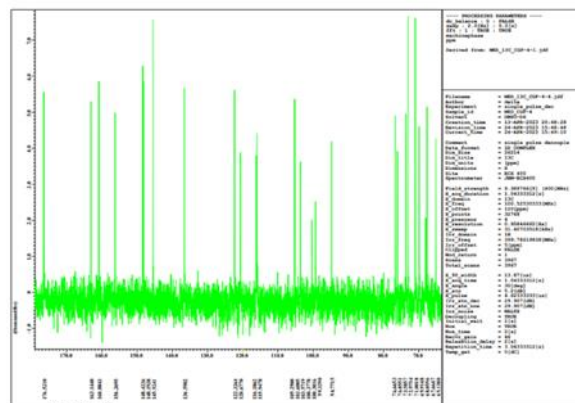
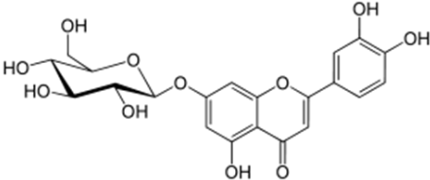
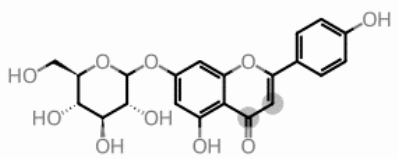
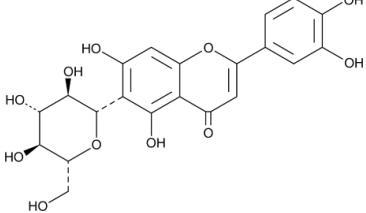
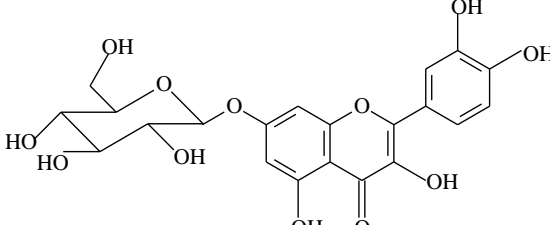
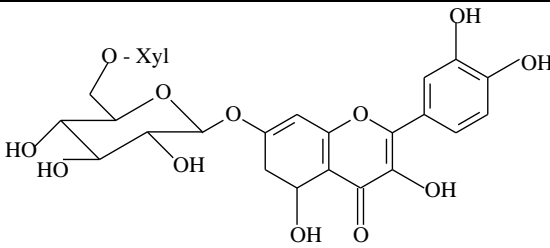


Рисунок 3 – ¹³C-ЯМР-спектр в DMSO-d₆ гигантозида В

Выделенные из листьев и из цветков цефаларии гигантской и идентифицированные вещества приведены в табл. 1.

**Таблица 1 – Вещества, выделенные из листьев и из цветков цефаларии
гигантской**

№ п/ п	Название соединения, формула	Структурная формула	Морфологически й орган
1	Цинарозид (7-О-β-D- глюкопиранозид лютеолина)		Листья и цветки
2	Космосин (7-О-β-О- глюкопиранозид апигенина)		Листья
3	Изоориентин (6-С-β-D- глюкопиранозид 5,7,3',4'- тетрагидроксифлавона)		Листья
4	Кверцимеритрин (7-О-β-D- глюкопиранозид 3,5,7,3',4'- пентагидроксифлаво а)		Цветки
5	Гигантозид В (7-О-β-D- глюкопиранозид-7-О- β-D-ксилопиранозид 3,5,7,3',4'- пентагидроксифлаво а)		Цветки

3. Разработка подходов к стандартизации листьев и цветков цефаларии гигантской

3.1. Качественный анализ листьев и цветков цефаларии гигантской

В целях разработки методики качественного анализа цветков и листьев цефаларии гигантской необходимы методы, обладающие оптимальными характеристиками по экспрессности и селективности. Наиболее оптимальным методом является тонкослойная хроматография. Проведенные нами исследования по выделению индивидуальных соединений позволили изолировать доминирующие флавоноиды цефаларии гигантской, содержащиеся в плодах и листьях. Основными флавоноидами при этом являются: цинарозид, лютеолин, кверцетин, гигантозид В, изокверцетин.

Необходимо отметить, что большинство флавоноидов являются относительно распространёнными в растительном мире и не могут быть строго специфичными для данного растения. Однако сочетанное присутствие данных веществ в совокупности даёт характерный хроматографический профиль растительного объекта, который можно рассматривать как высоко специфичный и позволяющий проводить диагностику цефаларии гигантской как таксона.

Кроме того, индивидуальное соединение – гигантозид В, обнаруженное впервые только в цефаларии гигантской позволяет усилить селективность подтверждения подлинности растительного сырья.

Для разработки методики качественного анализа нами использованы стандартные образцы флавоноидов изолированные в эксперименте из цветков и из листьев цефаларии гигантской и подтвержденные методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии.

При подборе оптимальной системы разделения СО флавоноидных структур испытывали гомогенную гликозидную систему растворителей: *n*-бутанол - уксусная кислота - вода в классическом соотношении 4:1:2. При этом в качестве подкислителя как правило используется ледяная уксусная кислота (рис. 4).

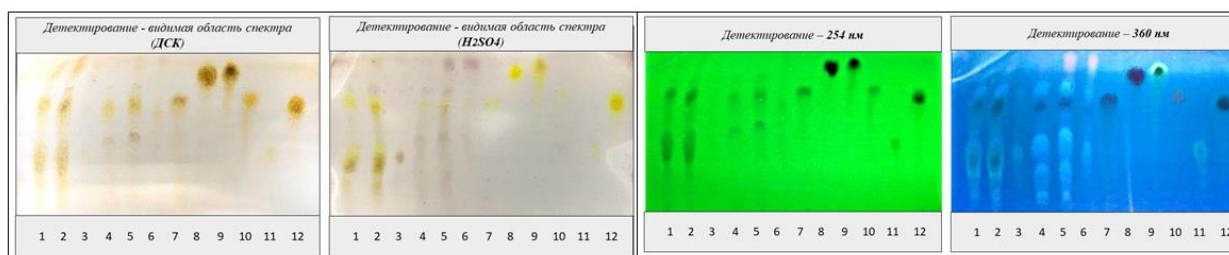


Рисунок 4 – Хроматограммы анализа водно-спиртовых извлечений из травы и из листьев цефаларии гигантской и стандартных образцов.

Обозначения: 1 – водно-спиртовое извлечение из цветков (40 % спирт этиловый), 2 – водно-спиртовое извлечение из цветков (70 % спирт этиловый), 3 – водно-спиртовое извлечение из цветков (96 % спирт этиловый), 4 – водно-спиртовое извлечение из листьев (40 % спирт этиловый), 5 – водно-спиртовое извлечение из листьев (70 % спирт этиловый), 6 – водно-спиртовое извлечение из листьев (96 % спирт этиловый), 7 – цинарозид, 8 – лютеолин, 9 – кверцетин, 10 – космосиин, 11 – гигантозид В, 12 – изокверцетин.

Хроматографирование в данной системе растворителей позволяет селективно определять большинство использованных нами флавоноидов по подвижности пятен R_f . Так подвижность пятен составила для СО цинарозид $R_f = 0,70$, СО космосиин – $R_f = 0,72$, СО гигантозид В $R_f = 0,40$, СО изокверцетин $R_f = 0,68$.

Не селективно делящимися в данной системе является флавоноиды лютеолин и кверцетин с $R_f = 0,88$.

Дополнительное детектирование по реакции окисления с 20% раствором серной кислоты повышает селективность проявления флавоноидов в цветках цефаларии гигантской, окрашивая их в желтый цвет.

В частности, на уровне соответствующего СО достоверно проявляются гигантозид В, а также изокверцетин.

Детектирование в УФ-свете с длиной волны 254 нм подтверждает аналогичную люминесценцию на уровне пятен, соответствующих СО: гигантозида В и изокверцетина в цветках. Цинарозид детектируется на уровне в соответствующего СО в листьях по характерному сине-фиолетовому свечению.

При облучении УФ-светом с длиной волны 360 нм подтверждается селективность люминесценции СО цинарозида – тёмно-синее свечение, отличающее его от свечения изокверцетина имеющего грязно-желтую флуоресценцию.

Также характерно люминесцирует СО гигантозид В, детектируемый в объекте на уровне стандарта с характерной светло-желтой флуоресценцией.

3.2. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях и цветках цефаларии гигантской

Методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях цефаларии гигантской.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 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 $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 90 мин. Затем ее охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (красная полоса). Испытуемый раствор 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 спиртом этиловым 96 % (испытуемый раствор А). Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 406 нм через 40 мин после приготовления. В качестве раствора сравнения раствор, используют раствор, полученный следующим образом: 1 мл извлечения (1:50) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора спиртом этиловым 96% до метки.

Приготовление раствора стандартного образца цинарозида.

Около 0,02 г (точная навеска) цинарозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15 мл 70% этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 70% этиловым спиртом до метки (раствор А цинарозида). 1 мл раствора А цинарозида помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (испытуемый раствор Б цинарозида). Раствор сравнения готовят следующим образом: 1 мл раствора А цинарозида помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (раствор сравнения Б цинарозида). Содержание суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

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

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D_o – оптическая плотность раствора СО цинарозида; m – масса сырья, г; m_o – масса СО цинарозида, г; W – потеря в массе при высушивании, %.

В случае отсутствия СО цинарозида целесообразно использовать рассчитанное значение удельного показателя поглощения при 406 нм – 323.

$$X = \frac{D \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{m \cdot 323 \cdot (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса сырья, г; 323– удельный показатель поглощения ($E_{1\text{ см}}^{1\%}$) СО цинарозида при 406 нм; W – потеря в массе при высушивании, %.

Критерием оценки аналитической методики является валидационная оценка. Валидацию методики проводили в соответствии с ГФ РФ XIV издания.

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

Специфичность методики определялась по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов листьев цефаларии гигантской и раствора СО цинарозида с алюминием хлоридом (дифференциальный вариант).

Линейность методики определяли для серии растворов цинарозида (с концентрациями в диапазоне от 0,04 до 0,2 мг/мл) с алюминием хлоридом при длине волны 406 нм. На основании полученных данных строили график зависимости значений оптической плотности растворов цинарозида с алюминием хлоридом от концентрации цинарозида и затем рассчитывали уравнение линейной регрессии (рис. 5, табл. 2).

При изучении линейной зависимости вида $y = bx + a$, коэффициент корреляции составил 0,9977, следовательно, данную методику можно использовать для анализа суммы флавоноидов в листьях цефаларии гигантской в пересчете на цинарозид в указанном диапазоне концентраций.

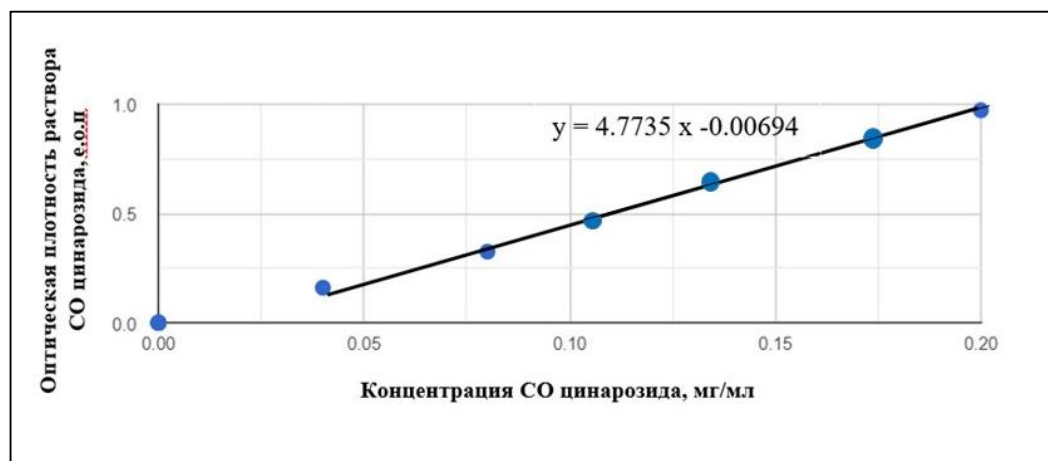


Рисунок 5 – Зависимость значений оптической плотности раствора цинарозида с алюминия хлоридом от концентрации цинарозида (дифференциальный вариант)

Таблица 2 – Исходные данные для оценки линейности методики

№ п/п	Концентрация раствора стандартного образца цинарозида, мг/мл	Значение оптической плотности, е.о.п. (среднее значение из трех последовательных измерений)
1	0,04	0,1604
2	0,08	0,3254
3	0,11	0,4962
4	0,14	0,6371
5	0,17	0,7823
6	0,2	0,9723

Метрологические характеристики методик количественного определения содержания суммы флавоноидов в водно-спиртовом извлечении листьев цефаларии гигантской представлены в таблице 3. Ошибка единичного определения суммы флавоноидов в листьях цефаларии гигантской с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 0,42\%$ (табл. 3).

Таблица 3 – Результаты оценки правильности методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях цефаларии гигантской (уровень повторяемости)

Метрологические характеристики	n	f	\bar{X} , %	S	$S_{\bar{x}}$	P, %	t (P, f) (табл.)	$\pm \Delta X$,	E, %
Значения	11	10	4,76	0,06	0,0181	95	2,23	0,1338	$\pm 2,80$

Установлено, что среднее содержание флавоноидов в исследуемом образце сырья составило 4,76% (относительная погрешность определения составила $\pm 2,80\%$).

Методика количественного определения суммы флавоноидов в цветках цефаларии гигантской.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин. Затем ее охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (красная полоса). Испытуемый раствор 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 спиртом этиловым 96 % (испытуемый раствор А). Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 426 нм через 40 мин после приготовления. В качестве раствора сравнения используют раствор, полученный следующим образом: 1 мл извлечения (1:50) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем раствора спиртом этиловым 96% до метки.

Приготовление раствора стандартного образца кверцетина.

Около 0,02 г (точная навеска) кверцетина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15 мл 96% этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 96% этиловым спиртом до метки (раствор А кверцетин). 1 мл раствора А кверцетина помещают в мерную колбу на 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (испытуемый раствор Б кверцетина). Раствор сравнения готовят следующим образом: 1 мл раствора А кверцетина помещают в мерную колбу на 25 мл и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (раствор сравнения Б кверцетина). Содержание суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

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

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; D_o – оптическая плотность раствора СО кверцетина; m – масса сырья, г; m_o – масса СО кверцетина, г; W – потеря в массе при высушивании, %.

В случае отсутствия СО кверцетина целесообразно использовать рассчитанное значение удельного показателя поглощения при 426 нм – 692.

$$x = \frac{D \cdot 50 \cdot 50 \cdot 100}{m \cdot 692 (100 - W)}$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора; m – масса сырья, г; 692 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{ см}}^{1\%}$) СО кверцетина при 426 нм; W – потеря в массе при высушивании, %.

Критерием оценки аналитической методики является валидационная оценка. Валидацию методики проводили в соответствии с ГФ РФ XIV издания.

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

Специфичность методики определялась по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов цветков цефаларии гигантской и раствора СО кверцетина с алюминием хлоридом (дифференциальный вариант).

Линейность методики определяли для серии растворов кверцетина (с концентрациями в диапазоне от 0,04 до 0,2 мг/мл) с алюминием хлоридом при длине волны 426 нм. На основании полученных данных строили график зависимости значений оптической плотности растворов кверцетина с алюминием хлоридом от концентрации кверцетина и затем рассчитывали уравнение линейной регрессии.

При изучении линейной зависимости вида $y = bx + a$, коэффициент корреляции составил 0,9921, следовательно, данную методику можно использовать для анализа суммы флавоноидов в цветках цефаларии гигантской в пересчете на кверцетин в указанном диапазоне концентраций (рис. 6, табл. 4).

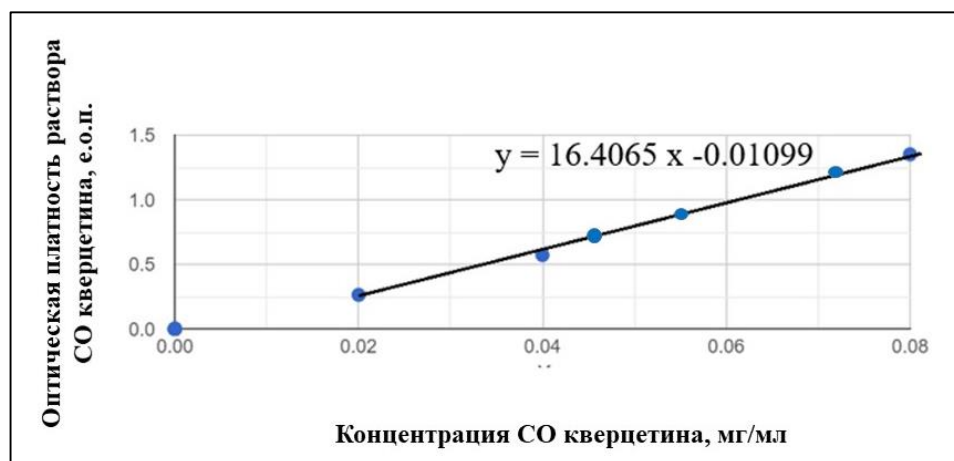


Рисунок 6 – Зависимость значений оптической плотности раствора кверцетина с алюминия хлоридом от концентрации кверцетина (дифференциальный вариант)

Таблица 4 – Исходные данные для оценки линейности методики

№ п/п	Концентрация раствора стандартного образца кверцетина, мг/мл	Значение оптической плотности, е.о.п. (среднее значение из трех последовательных измерений)
1	0,020	0,2636
2	0,040	0,5717
3	0,046	0,6012
4	0,057	0,8241
5	0,073	1,2391
6	0,080	1,3517

Метрологические характеристики методик количественного определения содержания суммы флавоноидов в водно-спиртовом извлечении цветков цефаларии гигантской представлены в таблице 3. Ошибка единичного определения суммы флавоноидов в цветках цефаларии гигантской с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 1,75\%$ (табл. 5).

Таблица 5 – Результаты оценки правильности методики количественного определения суммы флавоноидов в цветках цефаларии гигантской (уровень повторяемости)

Метрологические характеристики	n	f	\bar{X} , %	S	$S_{\bar{X}}$	P, %	T (P, t) (табл.)	$\pm \Delta X$	E, %
Значения	11	10	2,26	0,04	0,1206	95	2,23	0,0892	$\pm 3,95$

Установлено, что среднее содержание флавоноидов в исследуемом образце сырья составило 2,26% (относительная погрешность определения составила $\pm 3,95\%$).

Таким образом, исходя из результатов валидационной оценки результатов эксперимента, можно сделать вывод о пригодности использования данной методики для количественной оценки суммы флавоноидов в пересчете на кверцетин.

Методика качественного и количественного определения флавоноидов в цветках цефаларии гигантской.

В результате проведения ВЭЖХ-анализа выявлено, что в водно-спиртовом извлечении цветков цефаларии гигантской время удерживания гигантозида В составляет $3,50 \pm 0,02$ мин, кверцимеритрина – $4,90 \pm 0,03$ мин, кверцетина – $10,00 \pm 0,05$ мин. В указанных условиях хроматографирования стандартные растворы гигантозида В, кверцимеритрина и кверцетина имеет время удерживания $3,49 \pm 0,02$ мин; $4,86 \pm 0,03$ мин; $9,94 \pm 0,04$ мин соответственно (рис. 7).

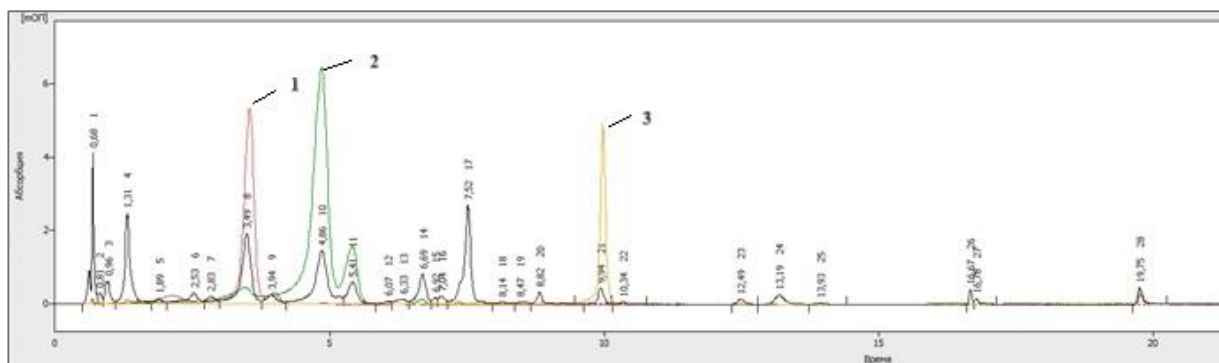


Рисунок 7 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из цветков цефаларии гигантской с добавлением стандартных образцов флавоноидов.

Детекция – 360 нм.

Обозначения: 1 – гигантозид В; 2 – кверцимеритрин; 3 – кверцетин.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 70% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 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 «МАЭСТРО ВЭЖХ» (ООО «Интерлаб») с УФ-детектором вводят 5 мкл полученного раствора. Хроматографируют в условиях обращенно-фазовой хроматографии на колонке ВЭЖХ Ультра 150 мм x 3 мм; С18 5 мкм, температура колонки должна поддерживаться при 30 °С, элюентная система: ацетонитрил (ПФА) – 1% раствор уксусной кислоты (ПФБ), скорость элюирования – 1 мл/мин. Профиль градиента представлен таблицей:

Проводят УФ-детектирование при длине волны 360 нм. Проводят не менее 3 параллельных определений.

Параллельно 5 мкл раствора кверцетина вводят в хроматограф и хроматографируют, как описано выше. Проводят определение площади пика кверцетина и рассчитывают среднюю площадь пика по результатам 3 определений (рис. 8).

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

Содержание кверцетина в цветках цефаларии гигантской 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 кверцетина испытуемого раствора, вычисленное из хроматограмм раствора испытуемого образца; S_0 – среднее значение площади пика раствора СО кверцетина, вычисленное из хроматограмм раствора СО кверцетина; V – объем извлечения, мл; V_1 – объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл; V_0 – объем раствора РСО кверцетина, мл; V_2 – объем вводимой пробы раствора РСО кверцетина, мкл; m – масса сырья, г; m_0 – масса РСО кверцетина, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

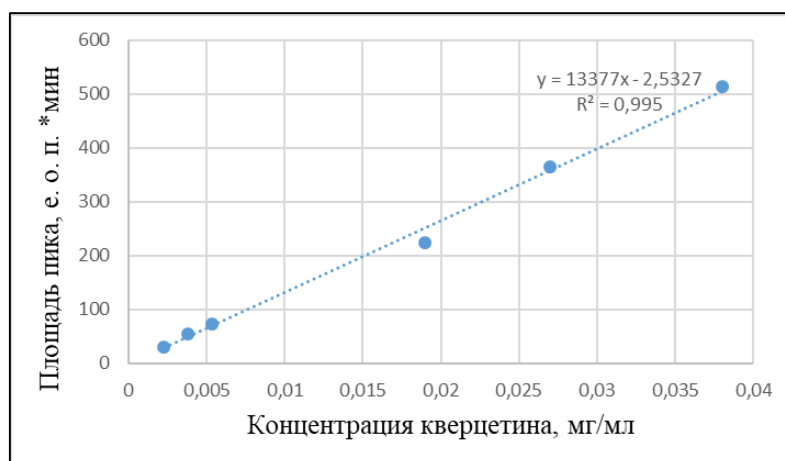


Рисунок 8 - График зависимости площади пика от концентрации кверцетина в пробе и уравнение линейной регрессии.

Метрологические характеристики разработанной методики ВЭЖХ-анализа свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения содержания кверцетина в цветках цефаларии гигантской с доверительной вероятностью 95 % составляет $\pm 15,8\%$ (табл. 6).

Таблица 6 – Результаты оценки правильности методики количественного определения суммы флавоноидов в цветках цефаларии гигантской (уровень повторяемости)

Метрологические характеристики	n	f	\bar{X} , %	S	$S_{\bar{X}}$	P, %	T (P, t) (табл.)	$\pm \Delta X$,	E, %
Значения	11	10	0,53	0,05	0,01507	95	2,26	0,03409	$\pm 6,40$

4. Обоснование перспективности использования в медицинской практике лекарственных препаратов на основе листьев и цветков цефаларии гигантской

4.1. Изучение антимикробной и противогрибковой активности водно-спиртовых извлечений и настойки листьев и цветков цефаларии гигантской

Для объективной оценки антимикробной и противогрибковой активности изучаемого сырья был проведен анализ водно-спиртовых извлечений с определением минимальной ингибирующей концентрации (МИК) в отношении основных клинически значимых штаммов микроорганизмов (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*). Препаратом сравнения с установленной антимикробной активностью являлся спирт этиловый марки ХЧ в различных концентрациях (40%, 70%, 96%), (разведение спирта производилась из спирта этилового 96%, ООО «Гиппократ», Россия, г. Самара, серия: 380221) и вода дистиллированная

Проведение анализа антимикробной активности водно-спиртовых извлечений из цефаларии гигантской, позволило получить следующие результаты (рис. 9).

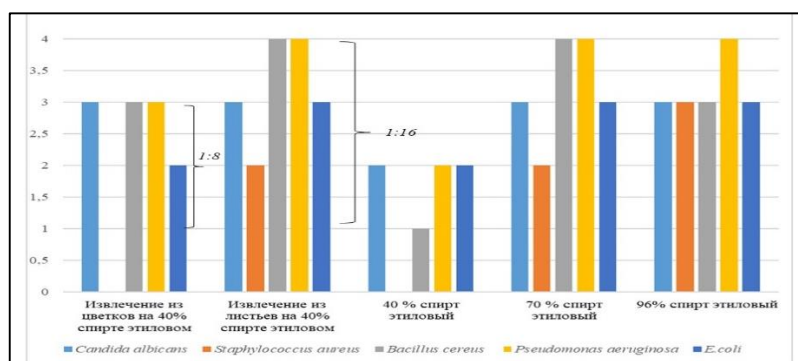


Рисунок 9 – Антимикробная активность водных и водно- спиртовых извлечений из листьев и цветков цефаларии гигантской.

Исследование противомикробной активности водно-спиртовых извлечений показала, что сумма веществ, извлекаемых спиртом концентрации 40 % оказывает противомикробную активность как в отношении грамположительных бактерий *S.aureus*, *B.cereus* так и грамотрицательных *P.aeruginosa* и *E.coli*. Дальнейшее повышение концентрации спирта снижает противомикробную активность извлечения в особенности из цветков цефаларии гигантской.

Не однозначный результат показали водно-спиртовые извлечения в отношении грамположительных бактерий *Staphylococcus aureus*. На фоне 40 % этилового спирта, не проявившего активность извлечения из листьев, показали значительную антибактериальную активность, задерживая рост *Staphylococcus aureus* при четырёхкратном разведении извлечений.

Дальнейшее повышение концентрации спирта (70 %) привело к повышению противомикробной активности извлечения из листьев (задержка роста при разведении 1:8) на фоне спирта этилового 70% оказывающего задержку роста лишь при четырёхкратном разведении.

Извлечения на 96 % этиловом спирте при сравнении с чистым экстрагентом опережали по задержке роста в отношении *B.cereus* 1:16 (извлечение из листьев).

4.2. Изучение токсичности сухих экстрактов из листьев и из цветков цефаларии гигантской

Одним из основных критериев оценки безопасности разрабатываемых лекарственных препаратов является определение острой токсичности. Исследование острой токсичности проводилось для сухих экстрактов на двух группах лабораторных крыс, эксперимент проводился в течение двух недель. За время эксперимента летальных исходов зафиксировано не было, также на протяжении всего исследования вес животных экспериментальной и контрольной групп практически не отличался. Таким образом, исследуемый препарат в соответствии с государственными требованиями к безопасности относится к IV классу токсичности (малоопасные вещества).

4.3. Изучение диуретической активности сухих экстрактов из листьев и из цветков цефаларии гигантской, а также диагностически значимого флавоноида - цинарозида

Изучение нефротропной (диуретической) активности 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. При формировании контрольных и опытных групп использовался метод случайного отбора путем жеребьевки. В каждую группу отобрали по десять крыс. За день до опыта животные получали внутрижелудочно водную нагрузку в объеме 3% от массы тела. Контрольная группа животных получала 3% водную нагрузку внутрижелудочно, исследуемое вещество вводили опытным животным в дозе 5 мг/кг, на фоне аналогичной водной нагрузки. После всех манипуляций животные рассаживались в обменные клетки на 24 ч. Пробы мочи собирали за 4 и 24 ч эксперимента. Определяли объем проб (диурез), концентрацию креатинина. Креатининурия определяли методом колориметрии на КФК-3. 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.

Спустя 4 ч у животных опытной группы отмечалось понижение диуреза и креатининурия. Исследование нефротропной (диуретической) активности показало, что в 24-х часовом эксперименте при однократном внутрижелудочном введении цинарозида в дозе 1 мг/кг у животных опытной группы относительно показателей водного контроля отмечалось достоверное повышение диуреза на 24%, в дозе 5 мг/кг (на 19%). При введении сухого экстракта цветков в дозе 10 мг/кг наблюдалось достоверное увеличение диуреза на 18%. При введении сухого экстракта листьев в дозе 10 мг/кг – повышение уровня креатининурия на 41%.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное фармакогностическое исследование цефаларии гигантской (*Cephalaria gigantea* (LEDEB.) Borb.) позволило сделать следующие **общие выводы**:

1. Обзор научной периодической литературы показал отсутствие достаточной информации о морфологическом и анатомо-гистологическом строении цефаларии гигантской, недостаточно изученном химическом составе листьев и стеблей данного вида цефаларии, а также недостаточном количестве данных по фармакологическим эффектам извлечений из цветков и листьев цефаларии гигантской.

2. Для листьев наиболее характерными особенностями являются следующие: наличие железистых трихом с двухрядными головками, простых кроющих одноклеточных волосков с возвышением и розеткой клеток у основания, а также с бородавчатой кутикулой; погруженность анамоцитных устьичных аппаратов на стеблях относительно эпидермы; лист имеет амфистоматический дорзовентральный тип; клеточные стенки эпидермы с нижней стороны листа имеют волнистую извилистость; клеточные стенки эпидермы с верхней стороны листа образуют четковидную структуру.

3. Для цветков цефаларии гигантской в качестве диагностически значимых особенностей строения отмечены: сосочковидные выросты по краю отгиба венчика, кроющие одноклеточные трихомы, структура гинецея с продолговатым рыльцем и пигментированными клетками эпидермы по краю рыльца, структура пыльцевых зерен треугольной формы с выростами на месте апертур, люминесценция вегетативной клетки пыльцевого зерна в виде узкого треугольника при облучении светом с $\lambda = 420$ нм.

4. Из листьев цефаларии гигантской, культивируемой в Российской Федерации, выделены и идентифицированы: цинарозид (7-О-β-D-глюкопиранозид лютеолина), космосиин (7-О-β-О-глюкопиранозид апигенина), изоориентин (6-С-β-D-глюкопиранозид 5,7,3',4'-тетрагидроксифлавона). Из цветков выделены и идентифицированы: кверцимеритрин (7-О-β-D-глюкопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона), гигантозид В (7-О-β-D-глюкопиранозид-7-О-β-D-ксилопиранозид 3,5,7,3',4'-пентагидроксифлавона), который является новым природным соединением.

5. Обоснована целесообразность определения методом ТСХ для листьев цинарозида и для цветков кверцетина и гигантозида В с использованием в качестве веществ-свидетелей стандартных образцов.

6. Определены характерные максимумы поглощения в диапазоне УФ- и видимого излучения извлечений из листьев и из цветков цефаларии гигантской на 70% спирте этиловом.

7. Разработаны методики количественного определения суммы флавоноидов в листьях и цветках цефаларии гигантской в пересчете на цинарозид и кверцетин методом дифференциальной спектрофотометрии при 406 нм и 426 нм соответственно.

8. В ходе исследования *in vitro* была изучена антимикробная активность водно-спиртовых экстрактов из цефаларии гигантской по отношению к *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Bacillus cereus*. Также была исследована противогрибковая активность в отношении *Candida albicans*. В результате было установлено, что экстракты обладают противомикробным и противогрибковым эффектом в отношении *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* и *Candida albicans* - рост штаммов ингибируется до 16-ти кратного разведения.

9. Определен IV класс токсичности (малоопасные вещества) для сухих экстрактов из листьев и цветков цефаларии гигантской.

10. Исследование нефротропного действия показало, что после однократного внутрижелудочного введения цинарозида в дозе 1 мг/кг в течение 24 часов, диурез у животных из опытной группы увеличился на 24% по сравнению с контрольными животными, получавшими только воду. При дозе 5 мг/кг диурез увеличился на 19%. При введении сухого экстракта цветков в дозе 10 мг/кг наблюдалось достоверное увеличение диуреза на 18%, а при введении сухого экстракта листьев в дозе 10 мг/кг – повышение уровня креатининурина на 41%.

11. Разработан проект фармакопейной статьи на новый вид ЛРС «Цефаларии гигантской цветки» и «Цефаларии гигантской листья» с учетом перспектив комплексной переработки цефаларии гигантской.

Практические рекомендации. Подходы к стандартизации сырья, разработанные в процессе работы над диссертацией, обеспечивают объективную и качественную оценку указанных объектов и позволяют решать вопросы их идентификации. Проекты фармакопейных статей «Цефаларии гигантской листья» и «Цефаларии гигантской цветки» рекомендуются к включению в Государственную Фармакопею РФ. Результаты исследования могут быть использованы в лабораториях центров сертификации и контроля качества лекарственных средств, на фармацевтических производствах, а также при преподавании дисциплин «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия».

Перспективы дальнейшей разработки темы. Проведение диссертационного исследования играет важную роль в решении задач фармакогностического и фармацевтического анализа, имея научно-практическую значимость. Необходимо отметить, что это особенно важно для внедрения перспективного представителя рода цефалария в фармацевтическую практику, а также для разработки унифицированных и научно обоснованных подходов к стандартизации других лекарственных растений и созданию новых лекарственных препаратов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Калашникова О.А. Исследование флавоноидного состава цветков цефаларии гигантской методом ВЭЖХ / О.А. Калашникова, В.М. Рыжов, В.А. Куркин, И.В. Соколова // **Химико-фармацевтический журнал.** – 2024. – Том 58. – № 2. – С. 83-88.
2. Калашникова, О. А. Хроматографическое исследование корневищ и корней Цефаларии гигантской / О.А. Калашникова, В.М. Рыжов, В.А. Куркин, Л.В. Тарасенко // Сборник материалов II Межвузовской научно-практической конференции с международным участием «Синтез наук как основа развития медицинских знаний», г. Самара. – 2021. – С. 309-315.
3. Калашникова, О. А. Цефалария гигантская как перспективный источник биологически активных соединений / О.А. Калашникова, В.М. Рыжов, В.А. Куркин // Сборник трудов конференции «Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы», посвященная 50-летию фармацевтического образования СамГМУ, г. Самара. – 2021. – С. 291-295.
4. Калашникова, О. А. Цефалария гигантская как перспективный фармацевтический объект / О.А. Калашникова, В.М. Рыжов, В.А. Куркин // **Фундаментальная наука в современной медицине – 2022: материалы научно-практической конференции студентов и молодых ученых**, г. Минск. – 2022 – С. 428.
5. Калашникова, О.А. Анализ пыльцы цефаларии гигантской / О.А. Калашникова, В.М. Рыжов, В.А. Куркин, Л.В. Тарасенко// Сборник материалов II научно-практической конференции с международным участием «Современные проблемы фармации». – Самара, 2023. – С. 68-71.
6. Калашникова, О.А. Антимикробная активность водно-спиртовых извлечений цефаларии гигантской (*Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobrov) / О. А. Калашникова, В. М. Рыжов, В. А. Куркин // **Материалы Всероссийской научно-практической**

- конференции с международным участием «Аспирантские чтения - 2022: Молодые ученые - медицине. Технологическое предпринимательство как будущее медицины». SIMS – 2021. Samara International Medical Science: сборник материалов, г. Самара. – 2023. – С. 277-280.
7. Калашникова, О.А. Методика количественного определения суммы флавоноидов в листьях цефаларии гигантской / О.А. Калашникова, В.М. Рыжов, В.А. Куркин // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2023. – Том 57. – № 3. – С. 29-34.
 8. Калашникова, О.А. Микроскопическое исследование травы цефаларии гигантской / О.А. Калашникова, А.А. Ушкова, В.М. Рыжов, Л.В. Тарасенко, И.В. Рузаева // Сборник материалов «Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы». – Самара, 2021. – С. 58-66.
 9. Калашникова, О.А. Нефротропная активность цинарозида – компонента цефаларии гигантской (*Cephalaria gigantea* (Ledeb.) Bobr.) / О. А. Калашникова, В. М. Рыжов, В. А. Куркин, Е. Н. Зайцева, А. С. Цибина, А. И. Алтарева // V Гаммермановские чтения. Сборник научных трудов по материалам научно методической конференции (9-10 ноября 2023 г.) : сборник статей / кол.авторов ; под общ. Ред. М.Н. Пovyдыш. – Москва : РУСАЙНС, 2023. – С. 104-105.
 10. Калашникова, О.А. Спектрофотометрическое исследование корневищ с корнями цефаларии гигантской / О.А. Калашникова, В.М. Рыжов, В.А. Куркин, Л.В. Тарасенко // Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «АСПИРАНТСКИЕ ЧТЕНИЯ – 2021: молодые ученые – медицине». SIMS – 2021. Samara International Medical Science: сборник материалов, г. Самара. – 2021. – С. 270-272.

Патенты

1. **Патент на изобретение** № 2807831 от 21.11.2023 г. «Способ количественного определения суммы флавоноидов в листьях цефаларии гигантской» / О.А. Калашникова, В.М. Рыжов, В.А. Куркин [Электронный ресурс]: База патентов России. – Режим доступа: https://www1.fips.ru/registers-doc-view/fips_servlet

Выражаю искреннюю благодарность за систематическую методическую и организационную помощь при выполнении диссертационного исследования заведующему кафедрой фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, д.фарм.н., заслуженному работнику высшей школы РФ, профессору В.А. Куркину.