

ВАСЬКОВА АНАСТАСИЯ ИГОРЕВНА

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ
ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА ТЫСЯЧЕЛИСТНИК
(*ACHILLÉA* L.)**

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:

доктор фармацевтических наук, профессор **Куркин Владимир Александрович**

Официальные оппоненты:

Зилфикаров Ифрат Назимович – доктор фармацевтических наук, профессор РАН, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», отдел химии природных соединений, главный научный сотрудник.

Латыпова Гузель Минулловна – доктор фармацевтических наук, профессор, кафедра фармации федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор

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

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. Одним из основных приоритетов, установленных распоряжением Правительства РФ от 07.06.2023 г. №1495-р «Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года», является создание инновационных препаратов в РФ в условиях политики импортозамещения. Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2030 года заключается в синтезе и внедрении отечественных лекарств, способных занимать конкурирующее положение, и прогрессе инновационных технологий в данной сфере. Это позволит не только сократить зависимость от импорта, но и повысить качество и доступность лекарств для населения.

В современной фармацевтической промышленности широко используется лекарственное растительное сырье (ЛРС) для создания и производства различных лекарственных растительных препаратов (ЛРП). С целью создания новых ЛРП, отвечающим современным требованиям эффективности и безопасности, продолжается поиск новых перспективных лекарственных растений, в частности, среди близкородственных видов. К сожалению, в текущий момент времени научный вопрос идентификации примесных видов, родственных целевому лекарственному растению, остается неразрешенным. Тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium* L.) – один из примеров растений рода Тысячелистник (*Achilléa* L.), который является таким представителем.

Методика определения подлинности травы тысячелистника обыкновенного, внесённая в Государственную фармакопею Российской Федерации XIV издания (ГФ РФ), подразумевает использование Судана III в качестве стандарта, хотя данное вещество отсутствует в составе сырья.

Также в методике количественного определения суммы флавоноидов, включённой в ГФ РФ, на стадии экстракции данного сырья предусмотрен этап кислотного гидролиза, с последующим определением суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин. На наш взгляд, этап кислотного гидролиза является нецелесообразным ввиду анализа в указанных условиях артефактов флавоноидных гликозидов (лютеолин и др.).

Степень разработанности темы. В обширном перечне имеющихся видов рода Тысячелистник (*Achilléa* L.) только тысячелистник обыкновенный является фармакопейным лекарственным растением. Так, тысячелистник хрящеватый и тысячелистник благородный, часто встречающиеся на территории Самарской области и РФ в целом, имеют морфологическое сходство с тысячелистником обыкновенным, что затрудняет диагностику фармакопейного вида, в особенности для измельченного сырья.

Актуален вопрос диагностики и с точки зрения фитохимии сырья. В раздел «Определение основных групп биологически активных веществ (БАВ)» включено применение соединений, которые не входят в состав растения, при этом отсутствует определение флавоноидов как группы БАВ, содержащихся в данном растении. Применение флавоноидов в качестве фармакопейных образцов актуально не только в целях стандартизации тысячелистника обыкновенного, но и близкородственных видов.

Также следует обратить внимание, что подверженность кислотному гидролизу флавоноидных гликозидов, особенно 7-О-гликозидов лютеолина (цинарозид) и апигенина (космосин), с применением спирта этилового 96%, содержащим 1% хлористоводородной кислоты концентрированной, представляет собой существенную трудность; кроме того, флавоноидные гликозиды плохо растворяются в 96% спирте этиловом. Данные факторы не позволяют обеспечить полную экстракцию диагностически значимых соединений, в связи с этим актуально совершенствование существующей методики количественного определения суммы флавоноидов.

Цель работы и основные задачи исследования. Целью данной диссертационной работы является сравнительное фармакогностическое исследование представителей рода

Тысячелистник (*Achillaea* L.) в плане совершенствования методик качественного и количественного анализа ЛРС «Тысячелистника обыкновенного трава».

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

1. Сравнительное морфолого-анатомическое исследование представителей рода Тысячелистник (*Achillaea* L.).
2. Сравнительное исследование химического состава видов рода Тысячелистник.
3. Разработка методик качественного анализа ЛРС «Тысячелистника обыкновенного трава» с использованием флавоноидных стандартных образцов.
4. Совершенствование методики количественного определения суммы флавоноидов в ЛРС «Тысячелистника обыкновенного трава».
5. Разработка методики определения космосиина методом ВЭЖХ в ЛРС «Тысячелистника обыкновенного трава».
6. Разработка некоторых показателей качества ЛРС «Тысячелистника обыкновенного трава».
7. Изучение антибактериальной, диуретической, нейротропной активности, а также острой токсичности экстрактов травы тысячелистника, эфирного масла тысячелистника обыкновенного и индивидуальных соединений.
8. Разработка проекта фармакопейной статьи (ФС) на ЛРС «Тысячелистника обыкновенного трава» для включения в Государственную фармакопею РФ XV издания.

Научная новизна. Выявлены диагностически значимые морфолого-анатомические признаки травы тысячелистника обыкновенного, хрящеватого и благородного методами световой и поляризационной микроскопии. Путём качественного и количественного анализа (подтверждённого статистически), изучены особенности соцветий, листочков обёртки, шипиков листьев, пыльцевого зерна.

На основе предложенных анатомо-морфологических диагностических признаков предлагаются такие параметры травы *Achillea millefolium* как фармакопейного вида, как:

- «Количество цветков в элементарном соцветии корзинка» – среднее количество цветков в элементарном соцветии корзинка должно насчитывать не менее 12 и не более 15;
- «Размеры листочка обёртки и степень его пигментации» – средняя длина длинных листочков обёртки варьирует от $5,2 \pm 0,11$ мм до $5,6 \pm 0,11$ мм, средняя ширина длинных листочков обёртки варьирует от $1,19 \pm 0,15$ мм до $2,30 \pm 0,15$ мм, соотношение 1:3; средняя длина коротких листочков обёртки варьирует от $2,9 \pm 0,15$ мм до $3,7 \pm 0,15$ мм, средняя ширина коротких листочков обёртки варьирует от $1,8 \pm 0,15$ мм до $2,4 \pm 0,15$ мм, соотношение 1:2; средняя доля пигментации периметра листочков – не менее $20,0 \pm 0,10\%$, но не более $49,0 \pm 0,10\%$.
- «Длина и ширина шипиков листьев» – длина от центра основания до вершины шипика варьирует от $62,9 \pm 0,1$ мкм до $63,4 \pm 0,1$ мкм, ширина в основании шипика варьирует от $54,6 \pm 0,2$ мкм до $55,0 \pm 0,2$ мкм, форма клиновидная;
- «Диаметр пыльцевого зерна и количество шипов на поверхности» – средний диаметр пыльцевого зерна составляет $25,4 \pm 2,3$ мкм, среднее число шипов на поверхности пыльцы – $21 \pm 1,7$.

В процессе изучения компонентного состава травы тысячелистника обыкновенного, растущего на территории Самарской области, впервые проведено извлечение и определение структуры путём ^1H -ЯМР- и ^{13}C -ЯМР- спектроскопии и масс-спектрометрия таких веществ, как космосиин (7-О-β-О- глюкопиранозид апигенина) и цинарозид (7-О-β-D-глюкопиранозид лютеолина). Кроме того, впервые из сырья данного растения выделен апигенин (5,7,4'-тригидроксифлавоон). Данные флавоноиды являются доминирующими и диагностически значимыми для травы тысячелистника обыкновенного. Кроме того, по итогам проведения кислотного и ферментативного гидролиза цинарозида выделен не обнаруженный в свободном виде в траве тысячелистника обыкновенного агликон, который был определен как лютеолин (5,7,3',4'-тетрагидроксифлавоон).

Впервые проведена разработка методики определения содержания суммы флавоноидов в пересчёте на цинарозид методом дифференциальной спектрофотометрии при $\lambda_{\max} = 400$ нм с параметрами стадии экстракции 50% спиртом этиловым. Содержание суммы флавоноидов для травы тысячелистника обыкновенного варьирует от $0,41 \pm 0,020\%$ до $0,74 \pm 0,030\%$ (в пересчёте на цинарозид).

Впервые проведена разработка методики качественного и количественного анализа определения состава и содержания флавоноидов методом ВЭЖХ в ЛРС «Тысячелистника обыкновенного трава». Также научно обоснована целесообразность использования космосиина в качестве стандартного образца в методике анализа данного сырья методом ВЭЖХ. Содержание космосиина в траве тысячелистника обыкновенного варьирует от $0,52 \pm 0,01\%$ до $0,66 \pm 0,02\%$.

Впервые проведен сравнительный анализ травы видов рода *Achillea* L. с использованием тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии. Содержание суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид и абсолютно сухое сырье в образцах анализа составило: в траве тысячелистника обыкновенного – $0,68 \pm 0,01\%$, в траве тысячелистника хрящеватого – $0,65 \pm 0,02\%$, в траве тысячелистника благородного – $0,69 \pm 0,02\%$.

Впервые проведен сравнительный анализ травы видов рода *Achillea* L. с использованием ВЭЖХ. Содержание космосиина в пересчете на абсолютно сухое сырье в изучаемых образцах сырья составило: в траве тысячелистника обыкновенного – $0,61 \pm 0,01\%$, в траве тысячелистника хрящеватого – $0,56 \pm 0,02\%$, в траве тысячелистника благородного – $0,62 \pm 0,02\%$.

Подтверждение научной новизны диссертационной работы – патент РФ на изобретение (Приложение №1).

Теоретическая и практическая значимость. По результатам анатомо-морфологического анализа, в том числе с использованием световой и поляризационной микроскопии, выявлены признаки наиболее значимые для диагностики травы видов рода *Achillea* L.:

- количество цветков в элементарном соцветии корзинка;
- размеры листочка обёртки и степень его пигментации;
- длина и ширина шипиков листьев;
- диаметр пыльцевого зерна и количество шипов на поверхности.

Для травы *Achillea millefolium* L. извлечены и приведены характеристики доминирующих и диагностически значимых флавоноидов – космосиина, апигенина, цинарозида и лютеолина.

Экспериментально подтверждены параметры экстракции флавоноидов травы *Achillea millefolium* L. (однократная экстракция сырья, экстрагент – этиловый спирт в концентрации 50%, соотношение «сырье-экстрагент» – 1:30, время экстракции – извлечение на кипящей водяной бане в течение 45 мин, степень измельчения сырья – 2 мм, реакция комплексообразования с $AlCl_3$ в течение 30 мин), а также целесообразность использования в качестве стандартного образца цинарозид. Также предлагается сохранение текущего числового показателя в ФС 2.5.0101.18 «Тысячелистника обыкновенного трава» ГФ РФ XIV издания – суммы флавоноидов не менее 0,4%.

При ВЭЖХ-анализе извлечения травы тысячелистника идентифицированы хлорогеновая кислота, цинарозид, космосиин, апигенин и лютеолин. Научно обоснованы параметры качественного и количественного анализа флавоноидов методом ВЭЖХ.

Для густого экстракта травы тысячелистника обыкновенного подтверждены диуретическая и нейротропная активность; по результатам анализа острой токсичности густой экстракт и индивидуальные соединения отнесены к 4 классу (малоопасные вещества). Для водно-спиртовых извлечений разных концентраций и эфирного масла из травы *Achillea millefolium* L. определен скрининг антимикробной активности. Эфирное масло из травы *Achillea millefolium* L. и 40% водно-спиртовое извлечение при воздействии на *Burkholderia cepenoscacia* (штамм 105) при разведении 1/128 имеют наиболее выраженный антимикробный

эффект. Анализ позволил выявить, что у остальных анализируемых образцов противомикробная активность невысока, при этом эфирное масло имеет схожий со спиртом эффект. В связи с этим данные образцы целесообразно исследовать в дальнейшем при разработке ЛФ сочетанной терапии муковисцидоза.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационной работы включены в учебно-образовательные и научно-исследовательские процессы кафедр Института фармации ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России: кафедра фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, кафедра химии Института фармации, кафедра медицинской химии, кафедра фармацевтической технологии с курсом биотехнологий, кафедра фармакологии имени заслуженного деятеля науки РФ профессора А.А. Лебедева, кафедра управления и экономики фармации – базовая кафедра «Аптеки Плюс» (акты внедрения). Кроме того, разработанные методики анализа травы *Achillea millefolium* L. апробированы и применяются при процессах производства на предприятиях ЗАО «Самаралектравы», ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области» (акты внедрения).

Личный вклад автора. Все проанализированные результаты, перечисленные в диссертационной работе, были получены автором. По итогам изучения анатомии и мофологии видов рода *Achillea* L. установлены диагностически значимые признаки травы *Achillea millefolium* L. Проведено фитохимическое исследование травы видов рода *Achillea* L. Выделены и идентифицированы 3 индивидуальные вещества из травы *Achillea millefolium* L.

Проведена разработка методик качественного и количественного анализов диагностически значимых флавоноидов для травы тысячелистника обыкновенного с использованием ТСХ, спектрофотометрии и ВЭЖХ, а также проведено сравнительное исследование между тремя видами рода *Achillea* L.

Для выявления диуретического и нейротропного эффекта изучены густой экстракт и извлеченные из травы тысячелистника обыкновенного флавоноиды – космосиин, апигенин, цинарозид и лютеолин. По результатам анализа острой токсичности густой экстракт и индивидуальные соединения отнесены к 4 классу (малоопасные вещества). Также проведено исследование жидких экстрактов разных концентраций и эфирного масла травы тысячелистника обыкновенного на антимикробную активность.

Разработан проект ФС на ЛРС «Тысячелистника обыкновенного трава».

Связь задач исследования с планами научно-исследовательских работ. Выполнение диссертационной работы проведено 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 сравнительном анализе примесных видов рода *Achillea* L., родственных целевому лекарственному растению, оценке актуальности и степени разработанности выбранной темы исследования.

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

Объекты текущей диссертационной работы – трава тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.), тысячелистника хрящеватого (*Achillea cartilaginea* Ledeb. ex Rechb.) и тысячелистника благородного (*Achillea nobilis* L.). Регионы, в которых были взяты образцы – Самарская область, Оренбургская область, Республика Татарстан. Также исследованы промышленные образцы сырья (АО «Красногорсклексредства»). Кроме сырья с цельным и измельченным виде, использовались водно-спиртовые извлечения из них, а также эфирное

масло. Анализ проводился с помощью актуальных техник, таких как световая и поляризационная микроскопия, современные виды хроматографий (тонкослойная, колоночная, высокоэффективная жидкосная), УФ-спектроскопия, ^1H -ЯМР- и ^{13}C -ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия, различные химические превращения (кислотный и ферментативный гидролиз), фармакологический метод, микробиологический метод.

Статистическая обработка результатов анализа проведена с применением специализированных программ в соответствии с ГФ РФ XIV издания.

Степень достоверности научных положений опирается на обширный набор экспериментальных данных, полученных при применении современных методов исследования, точность обработки информации, использование актуальных и проверенных источников данных. Анализ полученных результатов проводился с применением математических методов обработки 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. Параметры анатомо-морфологического анализа видами рода *Achilléa* L.
2. Результаты исследования компонентного состава травы *Achillea millefolium* L., в том числе выделение и идентификация индивидуальных соединений (апигенин, космосин, цинарозид, лютеолин).
3. Разработка методики качественного анализа травы *Achillea millefolium* L. методом ТСХ с использованием стандартных образцов флавоноидов.
4. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве *Achillea millefolium* L. в пересчете на цинарозид и абсолютно сухое сырье.
5. Результаты разработки методики качественного и количественного определения космосина в траве *Achillea millefolium* L. методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.
6. Результаты микробиологического и фармакологического исследования активности густого экстракта, водно-спиртовых экстрактов, эфирного масла, а также космосина, апигенина, цинарозида и лютеолина травы тысячелистника обыкновенного.
7. Результаты подготовки проекта ФС «Тысячелистника обыкновенного трава» для включения в ГФ РФ XV издания.

Публикации. По теме диссертационного исследования автором опубликовано 17 печатных работ, из них 6 статей в журналах, включенных ВАК в перечень рецензируемых научных изданий, в том числе 5 статей – в журналах, включенных в МБД. Получен 1 патент Российской Федерации на изобретение № 2806035 «Способ количественного определения суммы флавоноидов в траве тысячелистника обыкновенного».

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были представлены на симпозиумах, научных и научно-практических конференциях различных уровней (областного, всероссийского и международного): XI Международный симпозиум «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (г. Москва, 2022 г.), Научно-

практическая с международным участием конференция «Аспирантские чтения» (г. Самара, 2021, 2022 и 2023 гг.), Международная научно-практическая конференция «Достижения и перспективы создания новых лекарственных растительных препаратов» (г. Москва «ВИЛАР», 2023 г.), Научно-практическая с международным участием конференция, посвященная 50-летию кафедры токсикологической химии «Актуальные проблемы химической безопасности в сфере фармацевтической и медицинской науки и практики» (г. Пермь, 2022 г.), Всероссийская научно-практическая с международным участием конференция «Кромеровские чтения» (г. Пермь, 2023 г.), III Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы и перспективы фармацевтической науки и практики» (г. Кемерово, 2023 г.), Всероссийская с международным участием научно-практическая online-конференция, посвященная 50-летию фармацевтического образования СамГМУ «Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы» (г. Самара, 2021 г.), Научно-практическая с международным участием конференция «Современные проблемы фармации» (г. Самара, 2022, 2023 гг.), XI Международная научно-практическая конференция молодых учёных «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» (г. Москва, 2023 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 34 таблицы и 46 рисунков. Работа включает в себя введение, литературный обзор, объекты и методы исследования, четыре главы, представляющие результаты исследований, выводы и заключение, список литературы, состоящий из 113 источников, из которых 43 – на иностранном языке, а также приложение.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В диссертационной работе была исследована надземная часть (трава) видов рода *Achillea* L., произрастающих на территории Самарской области, Оренбургской области и Республики Татарстан, а также промышленные образцы фармакопейного сырья.

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

Анатомо-морфологический анализ проводился с использованием световой микроскопии («Motic DM – 1802», «Motic DM - 39C - N9GO – А») с увеличениями x40, x100, x400 и поляризационной микроскопии (Микроскоп поляризационный учебный ПЛМ-213 (кратность увеличения 40x – 630x, компенсаторы пластинки λ , источник света лампа галогеновая 6В, 20 Вт)).

Исследование растительного сырья проводили с использованием химических и физико-химических методов анализа. Для установления химического состава соцветий и травы бархатцев отклоненных был использован метод жидкостно-адсорбционной колоночной хроматографии; для разделения применялись силикагель марки силикагель КСК 50/100 (Россия). Характеристики веществ, выделенных из сырья тысячелистника обыкновенного, с целью их идентификации определяли путем регистрации ^1H -ЯМР-спектров, полученных на приборе «JNM-ESX 400» (399.78 МГц) и спектров ^{13}C -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.

Для исследования извлечений изучаемых видов сырья и выделенных веществ использовали метод тонкослойной хроматографии с пластинками «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» (Россия). Количественное определение суммы флавоноидов проводили на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) в кюветках с толщиной слоя 10 мм в диапазоне длин волн от 190 нм до 700 нм. ВЭЖХ-анализ методом обращенно-фазовой хроматографии в градиентном режиме на высокоэффективном жидкостном хроматографе «МАЭСТРО ВЭЖХ» ООО «Интерлаб» (колонка ВЭЖХ Ультра 150 мм x 3 мм; C18 5 мкм). Температура колонки поддерживалась при 30°C. Подвижная фаза: ацетонитрил (ПФА) – 1% раствор уксусной кислоты (ПФБ), скорость элюирования – 1 мл/мин. Детекцию веществ осуществляли при длине волны 340 нм. Объем инжестируемой пробы составил 10 мкл.

Определяли диуретическое, нейротропное и антимикробное действия густого экстракта травы тысячелистника обыкновенного, водно-спиртовых извлечений травы тысячелистника обыкновенного, эфирного масла травы тысячелистника обыкновенного, а также выделенных из данного вида растительного сырья флавоноидов. Была исследована также острая токсичность густого экстракта.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Анатомо-морфологическое исследование травы рода Тысячелистник

Предварительный литературный обзор позволил выделить ряд признаков, селективность которых необходимо проверить экспериментально:

- встречаемость цветков в элементарном соцветии корзинка;
- размерности обёрток элементарных соцветий корзинка;
- особенности пигментации края обёрток элементарных соцветий корзинка;
- шипики края листовой пластинки;
- структура пыльцевых зёрен.

В целях изучения диагностичности признака «встречаемость цветков в элементарном соцветии корзинка» с достоверно известных особей трёх видов – тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.), тысячелистника хрящеватого (*Achillea cartilaginea* Ledeb. ex Rchb.), тысячелистника благородного (*Achillea nobilis* L.) – отбирались соцветия корзинка каждого вида в числе 10 шт. Каждое соцветие препарировалось. Число трубчатых и язычковых цветков подсчитывалось вручную (рис. 1).

В целом встречаемость цветков в элементарном соцветии нестабильна и может колебаться на одной особи тысячелистника обыкновенного от 10 до 15 цветков в корзинке. Поэтому среднее значение количества цветков в элементарном соцветии корзинка является более устойчивым признаком, чем номинальная совокупность цветков в элементарном соцветии.

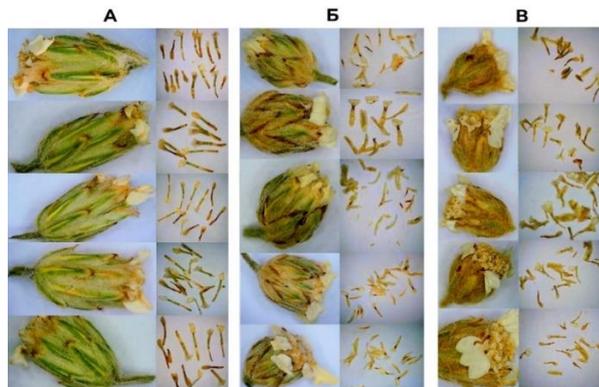
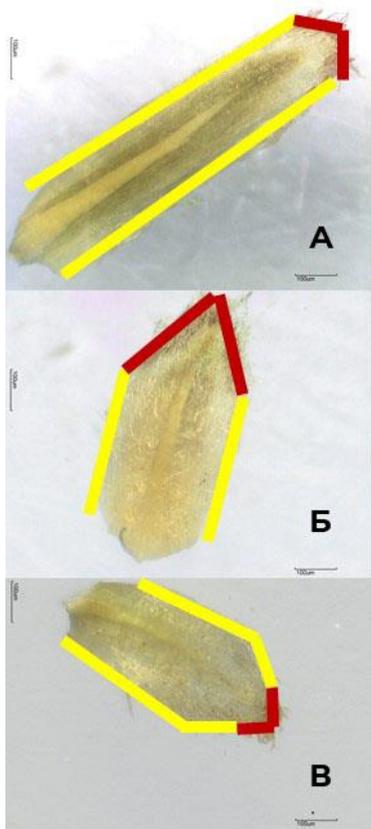


Рисунок 1 – Статистическая обработка признака «Количество цветков в элементарном соцветии корзинка»: А – тысячелистник обыкновенный; Б – тысячелистник хрящеватый; В – тысячелистник благородный.

Для более устойчивого дифференциального признака оценивалась степень пигментации в % от общей длины контура обёртки за исключением места её прикрепления

(основания). Определение степени пигментации проводили на выборке не менее 10 экземпляров обёрток. Процент пигментации в зависимости от вида тысячелистника указан на гистограмме (рис. 2).



Пигментированный участок периметра –

$1,3 \pm 0,12$ мм

Непигментированный участок периметра –

$4,2 \pm 0,18$ мм

Пигментированный участок периметра –

$2,1 \pm 0,17$ мм

Непигментированный участок периметра –

$2,1 \pm 0,13$ мм

Пигментированный участок периметра –

$0,5 \pm 0,1$ мм

Непигментированный участок периметра –

$3 \pm 0,13$ мм

Рисунок 2 – Статистическая обработка признака «Пигментация края обёртки»

Обозначения: *A* – тысячелистник обыкновенный; *B* – тысячелистник хрящеватый; *B* – тысячелистник благородный.

В эксперименте нами проанализировано диагностическое значение хрящевидного остроконечия или шипика для выбранных видов – тысячелистника обыкновенного, тысячелистника хрящеватого и тысячелистника благородного.

В целях анализа структуры и морфологии шипиков сравниваемых видов использовалась поляризационная микроскопия.

Для детального сравнения шипиков изучали длину и ширину остроконечия, а также его форму или очертание.

Поляризация через волновую пластинку λ позволила выявить неоднородную плотность шипиков сравниваемых видов. Более плотные клетки расположены по центру шипика. Обработка микропрепаратов 10% раствором сернокислого анилина не позволила выявить лигнификацию клеток шипика (рис. 3).

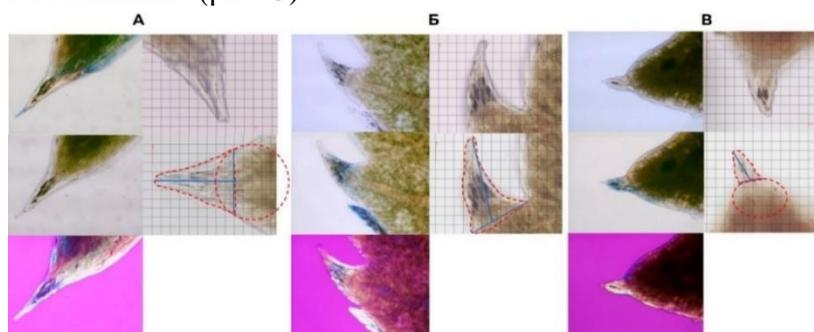


Рисунок 3 – Статистическая обработка признака «Длина и ширина шипика листа»: *A* – тысячелистник обыкновенный; *B* – тысячелистник хрящеватый; *B* – тысячелистник благородный.

Шипик тысячелистника обыкновенного треугольной или клиновидной формы, является прямым продолжением доли перистого листа, как правило, без видимых отступов.

Тысячелистник благородный, наиболее схожий с тысячелистником обыкновенным по габитусу, имеет иную структуру шипика. Сам шипик имеет остропризматическую форму. Его основание уже листовой доли, что визуально похоже на «прищипнутый» край.

Тысячелистник хрящеватый в сравнительном плане имеет цельную листовую пластинку, ввиду чего менее вероятен как примесный вид, однако в измельченном сырье возможен и диагностируется по особой когтевидной форме шипика, расположенного на дважды пальчатом крае листовой пластинки. Гистологически он схож с шипиками сравниваемых видов, но имеет загнутую, напоминающую коготь форму.

Одним из устойчивых и селективных признаков в ботанике, отличающих близкие таксоны, является строение пыльцевых зёрен. Однако подробный структурный анализ пыльцевого зерна при классической микроскопии в световом микроскопе невозможен. Ряд признаков не диагностируется. Опираясь на данные палеоботаники, выделены основные особенности пыльцевых зерен тысячелистника обыкновенного, тысячелистника хрящеватого и тысячелистника благородного. Наиболее удобными для диагностики в световой микроскопии являются такие признаки, как размер пыльцевого зерна, а также среднее число шипов на его поверхности.

В эксперименте нами проанализированы выборки в количестве не менее 10 пыльцевых зерен каждого вида. Результат подсчета средних величин и отклонения от выборки представлены на рисунке 4.

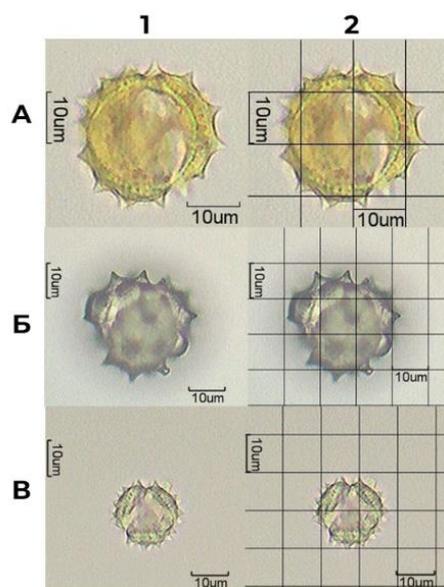


Рисунок 4 – Статистическая обработка признака «Количество шипов на поверхности пыльцы»: А – тысячелистник обыкновенный; Б – тысячелистник хрящеватый; В – тысячелистник благородный.

Обозначения: 1 – пыльцевое зерно ($\times 400$); 2 – размерность пыльцевого зерна.

По выявленным признакам разработаны и валидированы следующие параметры тысячелистника обыкновенного как фармакопейного вида:

- «Количество цветков в элементарном соцветии корзинка» – среднее число цветков должно составлять не ≤ 12 и не ≥ 15 ;
- «Размеры листочка обёртки и степень его пигментации» – средняя длина длинных листочков обёртки варьирует от $5,2 \pm 0,11$ мм до $5,6 \pm 0,11$ мм, средняя ширина длинных листочков обёртки варьирует от $1,19 \pm 0,15$ мм до $2,3 \pm 0,15$ мм, соотношение 1:3; средняя длина коротких листочков обёртки варьирует от $2,9 \pm 0,15$ мм до $3,7 \pm 0,15$ мм, средняя ширина коротких листочков обёртки варьирует от $1,8 \pm 0,15$ мм до $2,4 \pm 0,15$ мм, соотношение 1:2; средняя доля пигментации периметра листочков – не менее $20,0 \pm 0,1\%$, но не превыше $49,0 \pm 0,1\%$.

- «Длина и ширина шипиков листьев» – длина от центра основания до вершины шипика варьирует от $62,9 \pm 0,1$ мкм до $63,4 \pm 0,1$ мкм, ширина в основании шипика варьирует от $54,6 \pm 0,2$ мкм до $55,0 \pm 0,2$ мкм, форма клиновидная;

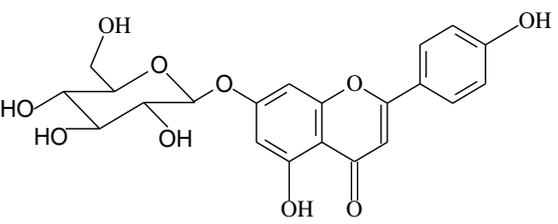
- «Диаметр пыльцевого зерна и количество шипов на поверхности» – D_{cp} пыльцевого зерна $25,4 \pm 2,29$ мкм, среднее число шипов на поверхности пыльцы – $21 \pm 1,7$.

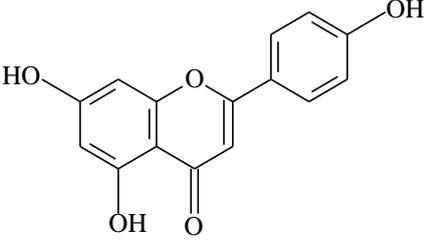
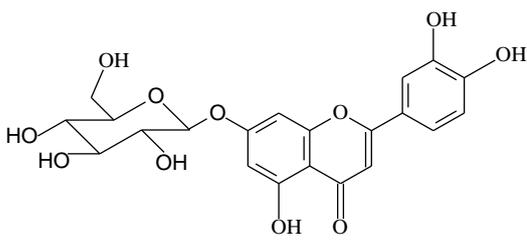
Научно обоснована целесообразность использования указанного перечня признаков для цельного и измельченного сырья, а также для порошка, анализ которого не описывался ранее в отечественной нормативной документации на траву тысячелистника обыкновенного.

2. Фитохимическое исследование травы рода *Achillea* L.

Для последующего анализа химического состава травы тысячелистника обыкновенного проводили выделение индивидуальных биологически активных соединений из данного вида растительного сырья методом адсорбционной колоночной хроматографии. Для определения химической структуры выделенных веществ использовали методы ^1H -, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, ТСХ, а также спектрофотометрии. Выделенные и идентифицированные вещества представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Физико-химические характеристики индивидуальных соединений, выделенных из травы тысячелистника обыкновенного

№ п/п	Название и химическая формула соединения	Характеристики вещества
1.	<p>Космосинн (7-О-β-О-глюкопиранозид апигенина) (1).</p> 	<p>Кристаллы светло-желтого цвета, $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{10}$, т.пл. $225\text{-}227^\circ\text{C}$ (водный спирт). λ_{max} EtOH 270, 334 нм; +NaOAc, 269, 378; +NaOMe, 278, 397; +AlCl_3, 279, 330, 347, 384; +$\text{AlCl}_3\text{+HCl}$ 279, 330, 347, 384.</p> <p>Спектр ЯМР ^1H (399.78 МГц, DMSO-d_6, δ, м.д., J/Гц): 12.92 (1H, с, 5-ОН группы), 10.37 (1H, с, 4'-ОН группы), 7.92 (2H, д, J = 9.0, H-2' и H-6'), 6.90 (2H, д, J = 9.0, H-3' и H-5'), 6.83 (1H, с, H-3), 6.79 (1H, д, J = 2.5, H-8), 6.40 (1H, д, J = 2.5, H-6), 5.03 (1H, д, J = 7.0, H-1'' глюкопиранозы), 3.2-4.6 (6H глюкозы).</p> <p>Спектр ЯМР ^{13}C (100.52 МГц, DMSO-d_6, δ_{C}, м.д.): 182.53 (C-4), 164.78 (C-7), 163.48 (C-2), 161.90 (C-5), 161.63 (C-2), 157.47 (C-9), 129.15 (C-2' и C-6'), 121.54 (C-1'), 116.52 (C-3' и C-5'), 105.86 (C-10), 103.63 (C-3), 100.41 (C-1'' глюкозы), 100.04 (C-6), 95.36 (C-8), 77.70 (C-5''), 76.96 (C-3''), 74.07 (C-4''), 73.62 (C-2''), 70.06 (C-4''), 61.12 C-6'').</p> <p>Масс-спектр (HR-ESI-MS, 180 °C, m/z): m/z 431,0980 [M - H]⁻, m/z 433,1128 [M + H]⁺, m/z 455,0948 [M + Na]⁺.</p>
2.	<p>Апигенин (5,7,4'-тригидроксифлавонон)</p>	<p>Кристаллы светло-желтого цвета, $\text{C}_{15}\text{H}_{10}\text{O}_5$, т.пл. $340\text{-}342^\circ\text{C}$ (водный спирт). λ_{max} EtOH 270 нм, 335; +NaOAc, 276, 377; +NaOAc +H_3BO_3 270, 380 нм; +AlCl_3, 279,</p>

		<p>330, 348, 386; +AlCl₃+HCl 279, 330, 348, 385; +NaOMe, 278, 382 нм.</p> <p>Спектр ЯМР ¹H (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12.92 (1H, с, 5-OH группы), 10.78 (1H, с, 7-OH группы), 10.31 (1H, с, 4'-OH группы), 7.88 (2H, д, J = 9.0, H-2' и H-6'), 6.89 (2H, д, J = 9.0, H-3' и H-5'), 6.73 (1H, с, H-3), 6.44 (1H, д, J = 2.5, H-8), 6.15 (1H, д, J = 2.5, H-6).</p> <p>Спектр ЯМР ¹³C (100.52 МГц, DMSO-d₆, δ_c, м.д.): 182.27 (C-4), 164.65 (C-2), 164.29 (C-7), 161.98 (C-5), 161.69 (C-4'), 157.83 (C-9), 128.99 (C-2' и C-6'), 121.69 (C-1'), 116.48 (C-3' и C-5'), 104.22 (C-10), 103.36 (C-3), 99.35 (C-6), 94.48 (C-8).</p> <p>Масс-спектр (HR-ESI-MS, 180 °C, m/z): m/z 269,0554 [M - H]⁻, m/z 271,0601 [M + H]⁺.</p>
3.	<p>Цинарозид (7-O-β-D-глюкопиранозид лютеолина)</p> 	<p>Кристаллы светло-желтого цвета состава C₂₁H₂₀O₁₁ с т.пл. 232-234 °C (водный спирт); λ_{max} EtOH 257, 266 нм, 352 нм; +NaOAc 258, 268 (пл), 380 нм; +AlCl₃, 276, 330, 350, 394.</p> <p>Спектр ЯМР ¹H (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12.94 (1H, с, 5-OH группы), 7.40 (дд, 9.0 и 2.0 Гц, H-6'), 7.37 (д, 2.0 Гц, H-2'), 6.85 (д, 9.0 Гц, H-5'), 6.74 (1H, д, 2.0 Гц, H-8), 6.70 (1H, с, H-3), 6.40 (д, 2 Гц, H-6), 5.03 (1H, д, 7.0 Гц, H-1''), 3.0-3.5 (м, 6H глюкозы).</p> <p>Масс-спектр (HR-ESI-MS, 180 °C, m/z): m/z 447,0929 [M - H]⁻, m/z 449,1079 [M + H]⁺, m/z 471,0899 [M + Na]⁺.</p>

Соединение **1** идентифицировано как **космосин (7-O-β-O-глюкопиранозид апигенина)**; соединения **2** и **3** идентифицированы как **апигенин (5,7,4'-тригидроксифлавоноид)** и **цинарозид (7-O-β-D-глюкопиранозид лютеолина)**. Следует отметить, что **апигенин (5,7,4'-тригидроксифлавоноид)** впервые выделен из сырья данного растения. Также по итогам проведения кислотного и ферментативного гидролиза цинарозида (**3**) выделен агликон, который был определен как **лютеолин (5,7,3',4'-тетрагидроксифлавоноид)**, не обнаруженный в свободном виде в траве тысячелистника обыкновенного. Флавоноиды **1-4**, описанные выше, впервые были обнаружены в экстракте из травы тысячелистника обыкновенного, который был заготовлен на территории Самарской области.

С целью совершенствования методики определения биологически активных веществ травы тысячелистника обыкновенного методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) нами были проведены хроматографические исследования и выявлен ряд особенностей хроматографических профилей изучаемых объектов. В качестве стандартов использовались не только вещества, выделенные из травы тысячелистника обыкновенного, а также рутин, кверцетин, кемпферол, хлорогеновая кислота, кофейная кислота, описанные ранее для данного вида сырья.

Анализ суммы флавоноидов методом спектрофотометрии показал, что в УФ-спектре водно-спиртового извлечения тысячелистника обыкновенного наблюдается батохромный сдвиг длинноволновой полосы флавоноидов, как и в случае цинарозида. При изучении УФ-спектров ГСО цинарозида было выявлено, что раствор данного стандарта в присутствии алюминия хлорида имеет максимум поглощения при длине волны 400 нм. В УФ-спектре водно-спиртового извлечения из травы тысячелистника обыкновенного в дифференциальном варианте выявлен максимум поглощения при длине волны 400 нм, который практически соответствует максимуму спиртового раствора цинарозида. Результаты данных исследований свидетельствуют о возможности исключения из фармакопейной методики процесса кислотного гидролиза флавоноидных гликозидов на стадии экстракции целевых веществ из сырья данного растения.

В результате проведения сравнительного спектрофотометрического анализа водно-спиртовых извлечений травы тысячелистника обыкновенного, тысячелистника хрящеватого и тысячелистника благородного (рис. 5-12) выявлено, что кривая поглощения их УФ-спектров обусловлена в основном гидроксикоричными кислотами, в частности, хлорогеновой и кофейной кислотами (290 пл. и 330 нм). При добавлении раствора алюминия (III) хлорида в водно-спиртовые извлечения из травы тысячелистника изучаемых видов наблюдается батохромный сдвиг длинноволновой полосы в области 400 нм, обусловленный флавоноидами.

В условиях дифференциальной спектрофотометрии (рис. 6, 8, 10) в УФ-спектрах водно-спиртовых извлечений обнаружен максимум поглощения при 400 ± 2 нм, что характерно для флавонов, в частности, апигенина, лютеолина и их глюкозидов (космосин, цинарозид и др.) (рис. 11, 12).

Изучение УФ-спектров раствора космосина (рис. 11), являющегося доминирующим флавоноидом травы тысячелистника обыкновенного, позволило выявить максимум поглощения при длине волны 340 ± 2 нм. Сопоставимые спектральные характеристики имеет и цинарозид (рис. 12).

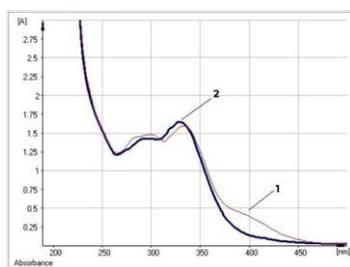


Рисунок 5 – Электронные спектры поглощения водно-спиртового извлечения из травы тысячелистника обыкновенного (1) и извлечения в присутствии алюминия хлорида (2)

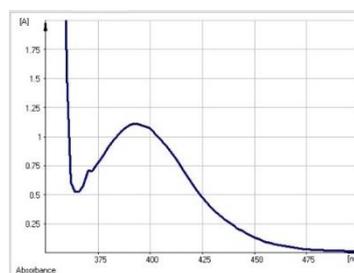


Рисунок 6 – Спектральная кривая поглощения раствора водно-спиртового извлечения из травы тысячелистника обыкновенного (дифференциальный спектр)

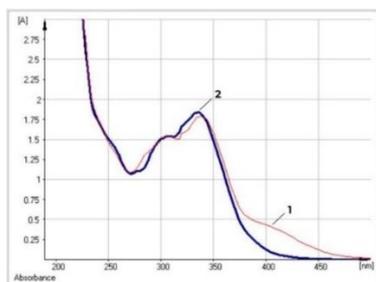


Рисунок 7 – Электронные спектры поглощения водно-спиртового извлечения из травы тысячелистника хрящеватого (1) и извлечения в присутствии алюминия хлорида (2)

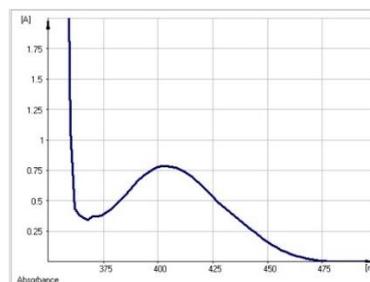


Рисунок 8 – Спектральная кривая поглощения раствора водно-спиртового извлечения из травы тысячелистника хрящеватого (дифференциальный спектр)

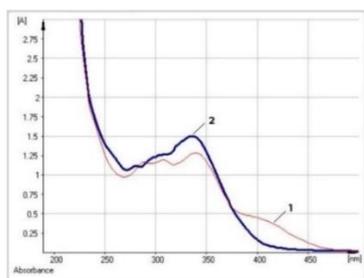


Рисунок 9 – Электронные спектры поглощения водно-спиртового извлечения из травы тысячелистника благородного (1) и извлечения в присутствии алюминия хлорида (2)

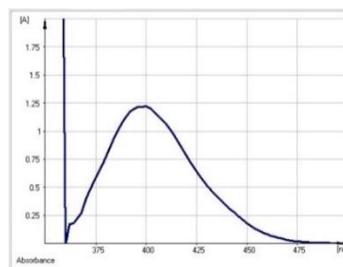


Рисунок 10 – Спектральная кривая поглощения раствора водно-спиртового извлечения из травы тысячелистника благородного (дифференциальный спектр)

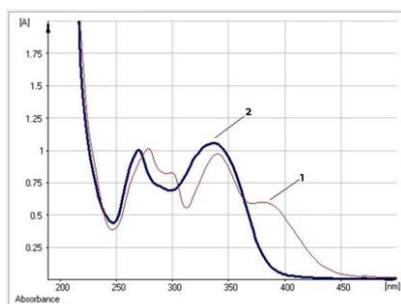


Рисунок 11 – Электронные спектры поглощения раствора космосина (1) и раствора космосина в присутствии алюминия хлорида (2).

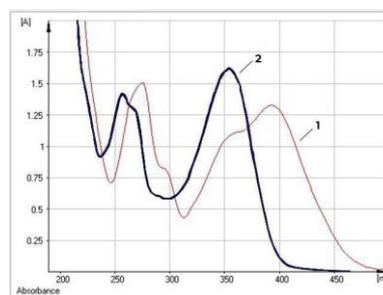


Рисунок 12 – Электронные спектры поглощения раствора цинарозида (1) и раствора цинарозида с добавлением алюминия хлорида (2).

Как уже было сказано ранее, космосин, будучи доминирующим флавоноидом, вносит существенный вклад в кривую поглощения извлечения из травы тысячелистника обыкновенного в области 330-350 нм. Данный длинноволновый максимум использован в качестве аналитической длины волны в методике качественного анализа данного флавоноида, а также при изучении компонентного состава травы тысячелистника обыкновенного, тысячелистника хрящеватого и тысячелистника благородного, так как в этой области поглощения находятся не только флавоноиды, но и гидроксикоричные кислоты (в частности, хлорогеновая и кофейная кислоты – в области 330 ± 2 нм).

При ВЭЖХ-анализе извлечения травы тысячелистника в указанных условиях хроматографирования идентифицированы хлорогеновая кислота, цинарозид, космосин, апигенин и лютеолин (рис. 13-15). Кроме того, в водно-спиртовом извлечении травы тысячелистника благородного выявлено наличие кофейной кислоты (рис. 15).

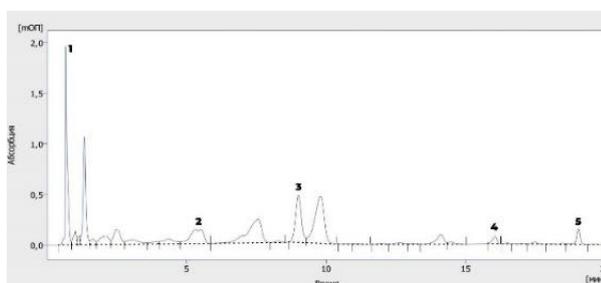


Рисунок 13 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из травы тысячелистника обыкновенного.

Обозначения: 1 – хлорогеновая кислота; 2 – цинарозид; 3 – космосин; 4 – лютеолин; 5 – апигенин.

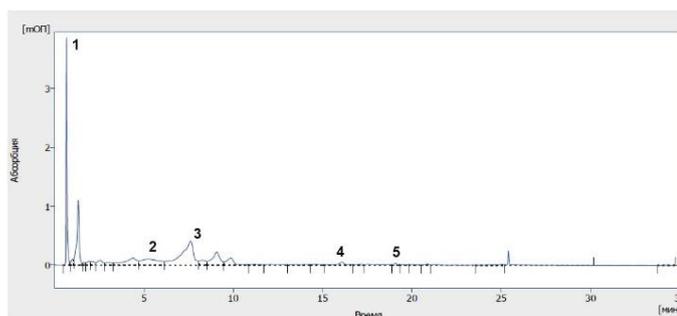


Рисунок 14 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из травы тысячелистника хрящеватого.

Обозначения: 1 – хлорогеновая кислота; 2 – цинарозид; 3 – космосин; 4 – лютеолин; 5 – апигенин.

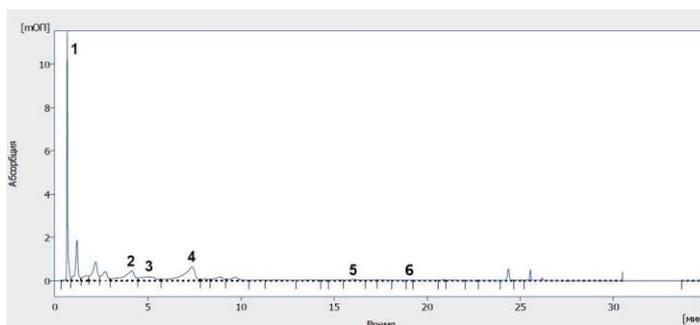


Рисунок 15 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из травы тысячелистника благородного.

Обозначения: 1 – хлорогеновая кислота; 2 – кофейная кислота; 3 – цинарозид; 4 – космосин; 5 – лютеолин; 6 – апигенин.

3. Разработка подходов к совершенствованию стандартизации травы тысячелистника обыкновенного.

В рамках диссертационной работы в рамках фитохимического исследования травы тысячелистника обыкновенного были выделены и идентифицированы диагностически значимые флавоноиды – апигенин, космосин, цинарозид и лютеолин. Следовательно, указанные соединения целесообразно использовать в качестве стандартных образцов при разработке методик определения основных групп БАС и количественного анализа данного вида сырья.

Определение подлинности сырья методом ТСХ

Поскольку доминирующими и диагностически значимыми БАС в траве тысячелистника являются флавоноиды, нами были выбраны следующие виды детектирования: система растворителей хлороформ – этанол – вода (25:18:2), обработка 3% спиртовым раствором алюминия хлорида, просматривание в УФ-свете при длинах волн 254 и 365 нм до и после обработки реактивом, обработка раствором диазобензолсульфокислоты в щелочной среде.

На хроматограмме обнаружены 3 зоны адсорбции, имеющие желтое окрашивание в видимом свете, яркое желтое свечение в УФ-свете при длине волны 365 нм (реагент – $AlCl_3$) и оранжево-желтое окрашивание при дальнейшей обработке щелочным раствором ДСК. Одна из зон адсорбции расположена на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора СО цинарозида с величиной $R_f \approx 0,7$, из чего можно заключить, что данное вещество является цинарозидом. Вторая доминирующая зона адсорбции с величиной R_s 1,3 относительно СО цинарозида отнесена нами к космосину. Также выявлена зона адсорбции желтого цвета с $R_f \approx 0,8$, что совпадает с величиной R_f СО апигенина.

Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в процентах в пересчете на цинарозид и абсолютно сухое сырье.

С целью разработки методики количественного определения суммы флавоноидов в траве тысячелистника обыкновенного были определены основные параметры пробоподготовки. Результаты исследования зависимости различных параметров экстракции на выход действующих веществ из сырья показали, что оптимальными условиями экстракции являются: степень измельчения сырья до размера частиц 2 мм, однократное извлечение 50% этиловым спиртом на кипящей водяной бане в течение 45 минут в соотношении «сырье-экстрагент» - 1:30. Пересчет суммы флавоноидов проводили на цинарозид.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в процентах в пересчете на цинарозид и абсолютно сухое сырье.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл 50% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 45 мин. Затем ее охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (красная полоса).

Испытуемый раствор для анализа суммы флавоноидов готовят следующим образом: 2 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида и доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96 % (испытуемый раствор).

Раствор сравнения готовят следующим образом: 2 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят объем раствора до метки 96% этиловым спиртом (раствор сравнения).

Для расчета содержания суммы флавоноидов готовят раствор стандартного образца цинарозида, добавляют к нему 2 мл 3% спиртового раствора алюминия хлорида, измеряют оптическую плотность окрашенного комплекса при аналитической длине волны 400 нм и определенное значение оптической плотности используют в формуле расчета.

Приготовление раствора стандартного образца цинарозида. Около 0,005 г (точная навеска) цинарозида помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 10 мл 50% этилового спирта при нагревании на водяной бане. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 96% этиловым спиртом до метки (раствор А цинарозида). 2 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: 2 мл полученного раствора помещают в мерную колбу на 25 мл, доводят объем раствора до метки спиртом этиловым 96%.

Измерение оптической плотности проводят при длине волны 400 нм через 30 минут после приготовления всех растворов.

Содержание суммы флавоноидов рассчитывается в пересчет на абсолютно сухое сырье. Содержание суммы флавоноидов (X в процентах) в пересчете на цинарозид и абсолютно сухое сырье вычисляют по формуле:

$$x = \frac{D * m_0 * 30 * 25 * 2 * 100 * 100}{D_0 * m * 25 * 2 * 25 * (100 - W)'} ,$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D_0 – оптическая плотность раствора стандартного образца цинарозида;

m – масса сырья, г;

m_0 – масса фармакопейного стандартного образца цинарозида, г;

30 – объём извлечения, мл;

25 – объём колбы для приготовления раствора А испытуемого раствора, мл;

2 – объём аликвоты для приготовления раствора А фармакопейного стандартного образца цинарозида, г;

100 – содержание основного вещества в фармакопейном стандартном образце цинарозида, %;
 25 – объём фармакопейного стандартного образца цинарозида, мл;
 25 – объём колбы для приготовления раствора А фармакопейного стандартного образца цинарозида, мл;
 2 – объём аликвоты извлечения для приготовления раствора А испытуемого раствора, мл;
 W – потеря в массе при высушивании, %.

В случае отсутствия стандартного образца цинарозида для расчета целесообразно использовать теоретическое значение удельного показателя поглощения при 400 нм – 340:

$$x = \frac{D * 30 * 25 * 100}{m * 2 * 340 * (100 - W)},$$

где D – оптическая плотность испытуемого раствора;

m – масса сырья, г;

m₀ – масса ФСО цинарозида, г;

30 – объём извлечения, мл;

25 – объём колбы для приготовления раствора А испытуемого раствора, мл;

m – масса сырья, г;

340 – удельный показатель поглощения (E^{1%}_{1cm}) фармакопейного стандартного образца цинарозида при 400 нм;

2 – объём аликвоты извлечения для приготовления раствора А испытуемого раствора, мл;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Исходя из результатов статистической обработки проведенных опытов, можно сказать о том, что ошибка единичного определения суммы флавоноидов в траве тысячелистника обыкновенного с доверительной вероятностью 95% составляет ±6,70% (табл. 2).

Таблица 2 – Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в тысячелистнике обыкновенном траве

n	f	\bar{X}	S	$S_{\bar{X}}$	P(%)	T(P, t)	ΔX	$\Delta \bar{X}$	E, %
11	10	0,4100	0,0121	0,00015	95,00%	2,2300	±0,0270	0,0080	±6,7000

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по показателям: специфичность, линейность, правильность и воспроизводимость. Специфичность методики определялась по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов травы тысячелистника обыкновенного (рис. 6) и цинарозида с алюминием хлоридом (рис. 16). Линейность методики определяли для серии растворов цинарозида (с концентрациями в диапазоне от 0,0022 до 0,011 мг/мл). Коэффициент корреляции составил 0,99791.

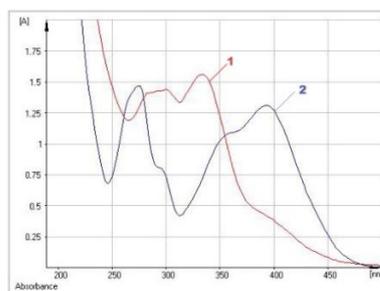


Рисунок 16 – Электронные спектры поглощения водно-спиртового извлечения из травы тысячелистника обыкновенного в присутствии алюминия хлорида (1) и раствора цинарозида в присутствии алюминия хлорида (2)

Содержание суммы флавоноидов для травы тысячелистника обыкновенного варьирует от $0,41 \pm 0,02\%$ до $0,74 \pm 0,03\%$ (в пересчете на цинарозид). Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют об определении суммы флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии при аналитической длине волны 400 нм в пересчете на цинарозид, причём с сохранением числового показателя – суммы флавоноидов не менее 0,4% в соответствии с ФС 2.5.0101.18 Государственной фармакопеи Российской Федерации 14 издания «Тысячелистника обыкновенного трава».

Разработка методики количественного определения космосиина в траве тысячелистника обыкновенного методом ВЭЖХ.

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

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл 50% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 45 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 («Красная лента»). Перед хроматографическим анализом дополнительно фильтруют через мембранный фильтр Milipore (0,22 мкм).

В жидкостной хроматограф «МАЭСТРО ВЭЖХ» (ООО «Интерлаб») с УФ-детектором вводят 10 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°C, элюентная система: ацетонитрил (ПФА) – 1% раствор уксусной кислоты (ПФБ), скорость элюирования – 1 мл/мин. Профиль градиента представлен в таблице:

Время, мин	ПФА, %	ПФБ, %	Режим
0-3	15	85	Изократический
3-12	15 → 20,4	85 → 79,6	Линейный градиент
12-22	20,4 → 40,0	79,6 → 60	Линейный градиент
22-25	40,0 → 80,0	80,0 → 20,0	Линейный градиент
25-35	80	20	Изократический

Проводят УФ-детектирование при длине волны 340 нм, диапазон чувствительности 0,5. Проводят не менее 3 параллельных определений.

Параллельно 10 мкл раствора космосиина вводят в хроматограф и хроматографируют, как описано выше. Определяют время удерживания и идентифицируют пик космосиина на хроматограмме испытуемого раствора. Вычисляют площадь пика космосиина на хроматограмме и рассчитывают среднюю площадь пика по 3 параллельным определениям.

Содержание космосиина в траве тысячелистника обыкновенного 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 космосиина испытуемого раствора, вычисленное из хроматограмм раствора испытуемого образца; S_0 – среднее значение площади пика раствора СО космосиина, вычисленное из хроматограмм раствора РСО космосиина; V – объем извлечения, мл; V_1 – объем вводимой пробы раствора испытуемого образца, мкл; V_0 – объем раствора СО космосиина, мл; V_2 – объем вводимой пробы раствора РСО космосиина,

мкл; m – масса сырья, г; m_0 – масса СО космосиина, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Метрологические характеристики разработанной методики ВЭЖХ-анализа свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения содержания космосиина в траве тысячелистника обыкновенного с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 5,28\%$.

Таблица 3 – Метрологические характеристики методики количественного определения космосиина в траве тысячелистника обыкновенного.

Образец	f	X_{cp}	S	$P, \%$	$t(P, f)$	ΔX	$E, \%$
Извлечение из травы тысячелистника обыкновенного	10	0,6210	0,1087	95,00	2,2300	$\pm 0,0327$	$\pm 5,28$

Установлено, что содержание космосиина в исследуемых образцах травы тысячелистника обыкновенного варьирует от $0,52 \pm 0,01 \%$ до $0,66 \pm 0,02 \%$.

4. Определение фармакологической активности препарата и индивидуальных соединений травы тысячелистника обыкновенного.

Проведены исследования фармакологической активности густого экстракта травы тысячелистника обыкновенного, а также флавоноидов в его составе – космосиина, апигенина, цинарозида и лютеолина. По результатам эксперимента выявлено достоверное изолированное снижение креатининурина в опытной группе относительно водного контроля за 4 ч опыта при введении апигенина и достоверное изолированное снижение креатининурина в опытной группе относительно водного контроля за 24 ч опыта при введении лютеолина. В 4-х часовых и суточных экспериментах достоверных изменений диуреза и креатининурина в опытных группах, получавших густой экстракт тысячелистника в дозе 10 мг/кг, отмечено не было.

Изучено действие густого экстракта травы тысячелистника обыкновенного, а также флавоноидов в его составе, на ЦНС. Определено, что густой экстракт в дозе 1 мг/кг и апигенин, космосиин и цинарозид в дозе 1 мг/кг способствовали достоверному повышению двигательной активности опытных животных относительно водного контроля, что может говорить о седативном действии образцов анализа.

Эфирное масло из травы *Achillea millefolium* L. и 40% водно-спиртовое извлечение при воздействии на *Burkholderia cenocepacia* (штамм 105) при разведении 1/128 имеют наиболее выраженный антимикробный эффект. Анализ выявил, что у остальных анализируемых образцов противомикробная активность невысока, при этом эфирное масло имеет схожий со спиртом эффект. В связи с этим данные образцы возможно исследовать в дальнейшем при разработке ЛФ сочетанной терапии муковисцидоза.

По результатам анализа острой токсичности выявлено, что трава тысячелистника обыкновенного относится к IV классу токсичности (малоопасные вещества).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное фармакогностическое исследование видов рода *Achillea* L. позволило сформулировать следующие общие выводы:

1. Сравнительное анатомо-морфологическое исследование травы видов рода *Achillea* L. методами световой и поляризационной микроскопии установлены наиболее значимые диагностические признаки травы тысячелистника обыкновенного, среди которых:

- количество цветков в элементарном соцветии корзинка;
- размеры листочка обёртки и степень его пигментации;
- длина и ширина шипиков листьев;
- диаметр пыльцевого зерна и количество шипов на поверхности.

2. На основе предложенных анатомо-морфологических диагностических признаков рекомендованы следующие параметры тысячелистника обыкновенного как фармакопейного вида:

– количество цветков в элементарном соцветии корзинка – среднее число цветков должно составлять не ≤ 12 и не ≥ 15 ;

– размеры листочка обёртки и степень его пигментации – средняя длина длинных листочков обёртки варьирует от $5,2 \pm 0,11$ мм до $5,6 \pm 0,11$ мм, средняя ширина длинных листочков обёртки варьирует от $1,19 \pm 0,15$ мм до $2,3 \pm 0,15$ мм, соотношение 1:3; средняя длина коротких листочков обёртки варьирует от $2,9 \pm 0,15$ мм до $3,7 \pm 0,15$ мм, средняя ширина коротких листочков обёртки варьирует от $1,8 \pm 0,15$ мм до $2,4 \pm 0,15$ мм, соотношение 1:2; средняя доля пигментации периметра листочков – не менее $20,0 \pm 0,1\%$, но не превыше $49,0 \pm 0,1\%$.

– длина и ширина шипиков листьев – длина от центра основания до вершины шипика варьирует от $62,9 \pm 0,1$ мкм до $63,4 \pm 0,1$ мкм, ширина в основании шипика варьирует от $54,6 \pm 0,2$ мкм до $55,0 \pm 0,2$ мкм, форма клиновидная;

– диаметр пыльцевого зерна и количество шипов на поверхности – D_{cp} пыльцевого зерна $25,4 \pm 2,29$ мкм, среднее число шипов на поверхности пыльцы – $21 \pm 1,7$.

3. Из травы тысячелистника обыкновенного выделены 4 флавоноида, которые на основании данных УФ-, 1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, а также результатов химических превращений (кислотный и ферментативный гидролиз) идентифицированы как космосиин (7-О- β -О- глюкопиранозид апигенина), апигенин (5,7,4'-тригидроксифлавоон) и цинарозид (7- О- β -D-глюкопиранозид лютеолина). Следует отметить, что апигенин (5,7,4'- тригидроксифлавоон) впервые выделен из сырья данного растения. По итогам проведения кислотного и ферментативного гидролиза цинарозида получен агликон, который был идентифицирован как лютеолин (5,7,3',4'- тетрагидроксифлавоон), не обнаруженный в свободном виде в *Achillea millefolium*. Данные флавоноиды впервые выделены из травы *Achillea millefolium*, заготовленной на территории Самарской области.

4. В рамках проведенных исследований по совершенствованию методик стандартизации травы тысячелистника обыкновенного установлено, что одним из способов определения подлинности сырья является ТСХ в системе растворителей хлороформ – этиловый спирт 96% – вода (25:18:2) с детекцией при $\lambda=366$ нм до и после нанесения спиртового раствора $AlCl_3$. В качестве стандартного образца для детектирования доминирующих флавоноидов сырья нами рекомендовано использовать космосиин и цинарозид.

5. Разработана методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид в траве *Achillea millefolium* в условиях дифференциальной спектрофотометрии при $\lambda_{max} = 400 \pm 2$ нм. Проведена оценка валидации разработанной методики. Содержание суммы флавоноидов в траве тысячелистника обыкновенного – от $0,41 \pm 0,02\%$ до $0,74 \pm 0,03\%$ (в пересчете на цинарозид). Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 6,70\%$. По результатам анализа подтверждена возможность стандартизации травы *A. millefolium* экстракцией 50% этанолом (без сопутствующего этой стадии кислотного гидролиза) с последующим определением суммы флавоноидов методом дифференциальной спектрофотометрии при аналитической $\lambda=400$ нм с нижним пределом не менее 0,4 % в соответствии с ФС 2.5.0101.18 Государственной фармакопеи Российской Федерации 14 издания

«Тысячелистника обыкновенного трава», однако в пересчёте не на лютеолин, а на цинарозид.

6. Проведен сравнительный анализ видов рода *Achillea* L. При ВЭЖХ- анализе видов рода *Achillea* L. в перечисленных условиях обнаружены: хлорогеновая кислота, цинарозид, космосиин, апигенин и лютеолин. Кроме того, в водно-спиртовом извлечении травы тысячелистника благородного выявлено наличие кофейной кислоты. Методом ВЭЖХ. Разработана методика определения содержания космосиина как доминирующего и

диагностически значимого флавоноида в траве *Achillea millefolium* методом ВЭЖХ. Проведена оценка валидации разработанной методики. Содержание космосиина в исследуемых образцах травы тысячелистника обыкновенного – от $0,52 \pm 0,01\%$ до $0,61 \pm 0,01\%$. Ошибка единичного определения с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 5,28\%$.

7. Эфирное масло из травы *Achillea millefolium* L. и 40% водно-спиртовое извлечение при воздействии на *Burkholderia cenocepacia* (штамм 105) при разведении 1/128 имеют наиболее выраженный антимикробный эффект. Анализ позволил выявить, что у остальных образцов анализа противомикробная активность невысока, при этом эфирное масло имеет схожий со спиртом эффект.

8. Определено, что густой экстракт травы тысячелистника обыкновенного обладает нейротропной и диуретической активностью, а также относится к IV классу токсичности (малоопасные вещества).

9. Разработан проект ФС «Тысячелистника обыкновенного трава» для включения в ГФ РФ XV издания.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Васькова, А.И. Разработка подходов к стандартизации травы тысячелистника обыкновенного / А.И. Васькова, В.А. Куркин // **Фармация**. – 2022. – Т. 71, № 4. – С. 12-18.
2. Васькова, А.И. Актуальные аспекты качественного и количественного анализа тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.) / А.И. Васькова, В.А. Куркин // **Аспирантский вестник Поволжья**. – 2022. – Т. 22, № 4. – С. 40-46.
3. Куркин, В.А. Вопросы совершенствования стандартизации травы тысячелистника обыкновенного / В.А. Куркин, А.И. Васькова // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2023. – Т. 26, № 6. – С. 17-22.
4. Куркин, В.А. Определение содержания космосиина в траве тысячелистника обыкновенного методом ВЭЖХ / В.А. Куркин, А.И. Васькова, И.В. Соколова // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2023. – Т. 57, № 9. – С. 32-37.
5. Kurkin, V.A. Determination of the Cosmosiin Content in Yarrow (*Achillea millefolium* L.) Herb by HPLC / V.A. Kurkin, A.I. Vaskova, I.V. Sokolova // **Pharmaceutical Chemistry Journal**. – 2023. – No. 57. – P. 1454–1459
6. Васькова, А.И. Сравнительное исследование компонентного состава травы некоторых видов рода *Achillea* L. / А.И. Васькова, И.В. Соколова, В.А. Куркин // **Химия растительного сырья**. – 2024. – №1. – С. 145–152.
7. Васькова, А.И. Сравнительное диагностическое исследование видов тысячелистника (*Achillea*), произрастающих на территории Самарской области / А.И. Васькова, В.А. Куркин, В.М. Рыжов, Л.В. Тарасенко // **Современные достижения фармацевтической науки и практики. Материалы Международной конференции, посвященной 60-летию фармацевтического факультета учреждения образования "Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет"**, Витебск, 31 октября 2019 года – Витебск: Витебский государственный медицинский университет, 2019. – С. 53-55.
8. Куркин, В.А. Сравнительное количественное определение суммы флавоноидов в траве тысячелистника обыкновенного методом спектрофотометрии / В.А. Куркин, А.И. Васькова // **Современные проблемы фармакогнозии. Сборник научных трудов Научно-практической онлайн-конференции с международным участием, посвященная 50-летию фармацевтического образования СамГМУ, Самара, 13 ноября 2021 года**. – Самара: ООО «СамЛюксПринт», Самарский государственный медицинский университет, 2021. – С. 42-47.
9. Васькова, А.И. Фармакогностическое изучение представителей рода Тысячелистник, произрастающих на территории Самарской области / А.И. Васькова // **Аспирантские чтения - 2021. Молодые ученые: научные исследования и инновации: Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием**,

Самара, 13-14 октября 2021 года. – Самара: ООО «СамЛюксПринт», Самарский государственный медицинский университет, 2021. – С. 257-259.

10. Куркин, В.А. Перспективы совершенствования методики определения суммы флавоноидов в тысячелистника траве / В.А. Куркин, А.И. Васькова // Фармацевтическое образование СамГМУ. История, современность, перспективы: сборник трудов научно-практической онлайн-конференции с международным участием, Самара, 26-27 октября 2021 год. – Самара: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение Высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 2021. – С. 246-250.

11. Васькова, А.И. Современные аспекты совершенствования методики определения суммы флавоноидов в траве тысячелистника обыкновенного / А.И. Васькова, В.А. Куркин // Фенольные соединения: свойства, активность, инновации: сборник научных статей по материалам XI Международного симпозиума, Москва, 11-15 апреля 2022 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, 2022. – С. 53.

12. Васькова, А.И. Особенности качественного анализа тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.) / А.И. Васькова // Аспирантские чтения - 2022: Молодые ученые – медицине. Технологическое предпринимательство как будущее медицины: Материалы всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Самара, 23-24 ноября 2022 года. – Самара: ООО «СамЛюксПринт», Самарский государственный медицинский университет, 2023. – С. 269-271.

13. Васькова, А.И. Современные подходы к стандартизации тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.) / А.И. Васькова, В.А. Куркин // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии. Научно-практическая конференция с международным участием «Актуальные проблемы химической безопасности в сфере фармацевтической и медицинской науки и практики», посвященная 50-летию кафедры токсикологической химии: Сборник материалов, Пермь, 14-15 декабря 2022 год. – Пермь, ПГФА, 2022. – С. 156-160.

14. Васькова, А.И. Современные подходы к стандартизации тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.) / А.И. Васькова, В.А. Куркин, И.В. Соколова // Кромеровские чтения 2023: сборник материалов всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Пермь, 26 апреля 2023 год. – Пермь, ПГФА, 2023. – С. 157-160.

15. Васькова, А.И. Сравнительный качественный анализ некоторых видов рода *Achillea* L. методом ВЭЖХ / А.И. Васькова, В.А. Куркин, И.В. Соколова // Актуальные проблемы и перспективы фармацевтической науки и практики: материалы III Международной научно-практической конференции, Кемерово, 26 мая 2023 год. – Кемерово, КемГМУ, 2023. – С. 248-251.

16. Васькова, А.И. Исследование компонентного состава травы тысячелистника обыкновенного методом ВЭЖХ / А.И. Васькова, В.А. Куркин, И.В. Соколова // Достижения и перспективы создания новых лекарственных растительных препаратов: сборник трудов международной научной конференции, Москва, 15-16 июня 2023 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений", 2023. – С. 266-270.

17. Васькова, А.И. Современные аспекты стандартизации видов рода *Achillea* L. / А.И. Васькова, В.А. Куркин, В.М. Рыжов, Л.В. Тарасенко // XI Международная научно-практическая конференция молодых учёных «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения: сборник трудов международной научной конференции, Москва, 30 ноября - 1 декабря 2023 года. – Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений", 2023. – С. 169-173.

Патент

Патент № 2806035 С1 Российская Федерация, МПК А61К 36/484, G01N 33/15. Способ количественного определения суммы флавоноидов в траве тысячелистника обыкновенного: № 2022131278: заявл. 30.11.2022: опубл. 25.10.2023 / А.И. Васькова, В.А. Куркин; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Самарский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.