

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

На правах рукописи

ВАСЬКОВА АНАСТАСИЯ ИГОРЕВНА

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

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
Куркин Владимир Александрович,
доктор фармацевтических наук,
профессор

Самара – 2024

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. РОД <i>ACHILLÉA</i> L.: ИСТОРИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ, СОВРЕМЕННАЯ КАРТИНА ИССЛЕДОВАНИЙ.....	16
1.1. Характеристика, ареал обитания видов рода <i>Achilléa</i> L.	16
1.2. Химический состав представителей рода <i>Achilléa</i> L.....	20
1.3. Фармакологические свойства и область применения травы тысячелистника обыкновенного	27
1.3.1. Применение тысячелистника в народной и официальной медицине	27
1.3.2. Применение тысячелистника в немедицинских целях	30
1.4. Вопросы стандартизации травы <i>A. millefolium</i> L.....	31
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1	33
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И ПРИМЕНЯЕМЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	35
2.1. Объекты исследования	35
2.2. Материалы, приборы и реактивы, использованные в работе	36
2.3. Характеристика методов исследования	37
2.3.1. Методы проведения морфолого-анатомического анализа.....	37
2.3.3. Анализ методами хроматографии	37
2.3.4. Физико-химические методы анализа	39
2.3.5. Технологические методы анализа	39
2.3.6. Фармакологические методы анализа	40
ГЛАВА 3. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАТОМО-ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИДОВ РОДА ТЫСЯЧЕЛИСТНИК	43
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3	75
ГЛАВА 4. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЕЩЕСТВ ИЗ ТРАВЫ ТЫСЯЧЕЛИСТНИКА ОБЫКНОВЕННОГО.....	76
4.1. Извлечение индивидуальных соединений из травы <i>A. millefolium</i> L.....	76
4.2. Идентификация выделенных веществ из травы <i>Achillea millefolium</i>	77
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4	83
ГЛАВА 5. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ТРАВЫ ТЫСЯЧЕЛИСТНИКА.....	84
5.1. Определение подлинности видов рода <i>Achilléa</i> L. методом ТСХ....	84

5.2. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчёте на цинарозид и абсолютно сухое сырьё.....	87
5.3. Определение содержания космосиина методом ВЭЖХ	97
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5	105
ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГУСТОГО ЭКСТРАКТА И ФЛАВОНОИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТРАВЫ ТЫСЯЧЕЛИСТНИКА ОБЫКНОВЕННОГО	106
6.1. Изучение диуретической активности густого экстракта и флавоноидов травы тысячелистника обыкновенного.....	107
6.2. Изучение нейротропной активности густого экстракта тысячелистника и флавоноидов, выделенных из травы тысячелистника обыкновенного	109
6.3. Изучение антимикробной активности извлечений из травы <i>Achillea millefolium</i>	110
6.4. Изучение острой токсичности густого экстракта травы тысячелистника обыкновенного.	114
ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6	115
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	116
Список литературы	120
ПРИЛОЖЕНИЯ	134
Приложение 1. Патент на изобретение «СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ ТЫСЯЧЕЛИСТНИКА ОБЫКНОВЕННОГО».....	135
Приложение 2. Акты внедрения результатов диссертационной работы....	136
Приложение 3. ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР - и масс-спектры индивидуальных соединений, выделенных из травы тысячелистника обыкновенного.	143
Приложение 4. Проект фармакопейной статьи на новый вид лекарственного растительного сырья «Тысячелистника обыкновенного трава».	149

ВВЕДЕНИЕ

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 (*Achilea millefolium* L.) – один из примеров растений рода Тысячелистник (*Achillea* 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 (космосиин), 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 (*Achilléa* 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 (*Achilléa* 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 космосирина 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 пыльца – $21 \pm 1,7$.

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'-тригидроксифлавоноид). 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'-тетрагидроксифлавоноид).

Впервые проведена разработка методики определения содержания суммы флавоноидов в пересчете 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 пересчете 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 космосирина в качестве стандартного образца в методике анализа данного сырья методом ВЭЖХ. Содержание космосирина 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 космосирина 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 *Achilléa* 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 milefolium* 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 milefolium* L. определен скрининг антимикробной активности. Эфирное масло из травы

Achillea millefolium L. и 40% водно-спиртовое извлечение при воздействии на *Burkholderia cepocerasia* (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 морфологии видов рода *Achilléa* L. установлены диагностически значимые признаки травы *Achillea millefolium* L. Проведено фитохимическое исследование травы видов рода *Achilléa* L. Выделены и идентифицированы 3 индивидуальных 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 *Achilléa* 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 *Achilléa* 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 Rchb.) 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 цельном и измельченном 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 ¹³C-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, космосиин, 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 космосиина 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 космосиина, 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.

ГЛАВА 1. РОД *ACHILLÉA* L.: ИСТОРИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ, СОВРЕМЕННАЯ КАРТИНА ИССЛЕДОВАНИЙ.

1.1. Характеристика, ареал обитания видов рода *Achilléa* L.

Род Тысячелистник (*Achilléa* L.) входит в крупнейшие роды семейства *Asteraceae* (около 200 видов травянистых многолетников). Их распространенность описана по различным областям Европы, Азии и Северной Америки (рис. 1) [63, 72, 79, 82]. В РФ и странах СНГ присутствует около 45 видов, из которых 17 можно найти на европейской территории РФ. Также существует множество гибридных форм этого рода [3, 14, 34, 41, 61, 63]. Растения рода *Achilléa* L. распространены практически во всех регионах, в основном предпочитая леса, десостепи и степи, суходольные лесные луга, светлые разреженные леса, края полей и дорог. Произрастают на бедных, но не чрезмерно кислых почвах; стойки к вытаптыванию, чувствительны к затенению. В связи с высокой степенью распространенности в природе не требуют специальных условий для интродукции [3, 14, 34, 41, 61, 63].

Впервые номенклатурное описание данного рода было дано Карлом Линнеем в 1753 году [98]. Однако известны и названия из народной медицины: *Sourcil de Venus* (фр. «бровь Венеры»), *Mausleiter* (нем. «мышьяная лестница»), *Venusaugenbraunen* (нем. «каринки в глазах Венеры»), Грыжная трава, Грудная трава, Растиральник и другие. В каждом языке имеется определенное количество народных, просторечных и диалектных названий данного растения, и всего их насчитывается 237 [47, 59].

Основная сложность классификации видов рода *Achilléa* связана с высокой полиморфностью многих видов и их слабой разграниченностью по большинству диагностически значимых признаков [3, 14, 34, 41, 61, 63]. В настоящее время род Тысячелистник включает два подрода: *Achilléa* и *Ptarmica*. Различия двух подродов сводятся к разнице в строении листьев: сильная изрезанность листовой пластинки у «настоящих» *Achilléa* и, как правило, цельная у *Ptarmica* [3].

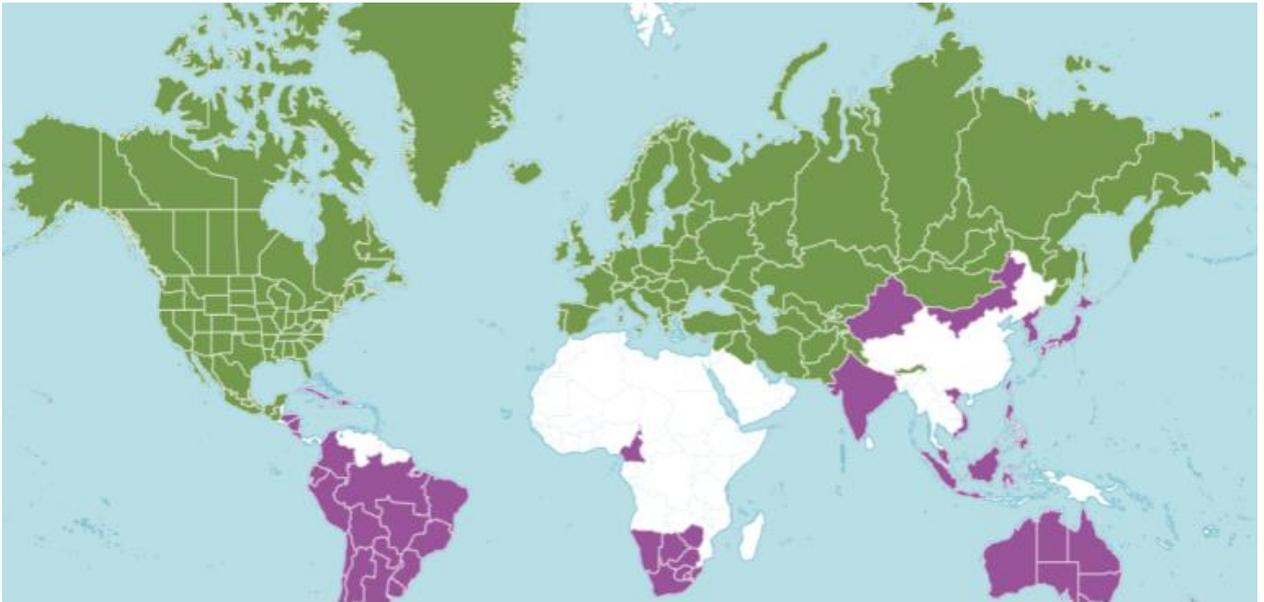


Рисунок 1 – Карта ареалов рода Тысячелистник (*Achilléa* L.) [72]

Тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium* L.) – многолетнее растение с длинными подземными побегами. Стебли многочисленные или одиночные, обычно слабоопушенные (тонко-пушистые), 10-80 см высотой [14, 34, 41, 61, 63, 72]. Листья данного растения ланцетные, продолговатоланцетные или почти линейные, дважды-трижды перисторассеченные; стержень листьев (его крылатая ось) шириной 0,6 – 2 мм. Ширина оберток соцветий тысячелистника обыкновенного 2,6 – 4 мм, по форме они цилиндрические или бокальчатые, с тёмной или светлой коричневой каймой. Цвет язычков краевых цветков белый, розовый или красный; длина от 1,5 до 4 мм. Трубчатые цветки в количестве до 20, снаружи с желёзками [14, 34, 41, 61, 63, 72].

Следует обратить внимание, что тысячелистник обыкновенный представляет собой полиморфный вид, который сильно варьирует по своим характеристикам. Эти различия могут включать размеры растения, наличие волосков на поверхности, степень рассечения листьев, размер и форму цветочных корзинок, а также форму и размер лепестков краевых цветков и другие аспекты [3, 4, 14, 34, 41, 61, 63, 72, 79, 82].



Рисунок 2 – Тысячелистник обыкновенный (*Achillea millefolium* L.)

[50]

Тысячелистник благородный (*Achillea nobilis* L.) – многолетнее растение с коротким многоглавым корневищем [14, 34, 41, 61, 63, 72]. Стебли данного растения немногочисленные, по 3-6, реже по 12, или одиночные, 15-50 см высотой, сильнее опушенные. Листья тысячелистника благородного в общем очертании яйцевидно-ланцетные, стержень их от середины или почти от основания пластинки с основными и промежуточными, более мелкими дольками или зубцами. Обертки соцветий тысячелистника благородного по форме яйцевидные, реже продолговато-яйцевидные, длина от 2 до 3,5 мм, ширина от 1,5 до 2,5 мм. Кайма на листочках выражена слабо. По цвету язычковые цветки *Achillea nobilis* L. от белых до бело-желтоватых, от 1,0 до 1,6 мм шириной, в 3 – 3,5 раза короче обертки. Тысячелистник благородный, подобно тысячелистнику обыкновенному, проявляет значительную вариативность в характере рассечения листовых сегментов, степени опушения и другим признакам [14, 34, 41, 61, 63, 72].



Рисунок 3 – Тысячелистник благородный (*Achillea nobilis* L.) [50]

Тысячелистник хрящеватый (*Achillea cartilaginea* Ledeb. ex Rchb.) – многолетнее растение с коротким корневищем, серо-зеленого (иногда серого) цвета, покрыт короткими вьющимися волосками [14, 34, 41, 61, 63, 72]. Стебли данного растения прямые и олиственные, ветвистые, достигают высоты 20-150 см. Листья тысячелистника хрящеватого сидячие, плоские, имеют форму ланцета или линейно-ланцетную, с цельным краем, с двойными пильчато-зубчатыми краями и покрытыми золотистыми или чёрными желёзками как сверху, так и снизу на всех листьях. Обёртка соцветий данного растения черепитчатая, трёхрядная; листочки обёртки широколанцетные, с выступающей жилкой, жёлтые или жёлтые с коричневым окаймлением, 1-3 мм длиной и 1,5 – 5 мм шириной. В соцветии тысячелистника хрящеватого 8 краевых цветков, пестичные язычковые, от 2 до 5 мм длиной, по трубке с одиночными головчатыми желёзками; язычки могут быть белыми или белыми с фиолетовым основанием, овальной формы, от 1 до 3 мм длиной и от 1,3 до 3,25 мм шириной, на верхушке с 3 закруглёнными зубчиками; цветочки диска пятизубчатые, белые, трубчатые, обоеполые, 1,5 – 2,6 мм длиной, опушенные одиночными головчатыми волосками [14, 34, 41, 61, 63, 72].



Рисунок 4 – Тысячелисник хрящеватый (*Achillea cartiaginea* Ledeb. ex Rchb.) [50]

1.2. Химический состав представителей рода *Achilléa* L.

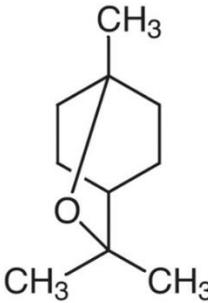
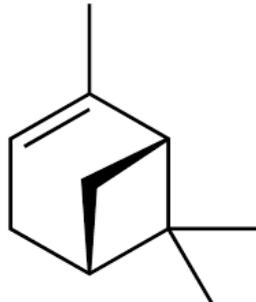
Тысячелистник обыкновенный присутствует в Государственной фармакопее СССР IX–XI издания и ГФ РФ XIV издания [11]. Имеется широкий опыт применения тысячелисника обыкновенного как в народной, так и в научной медицине. Кроме того, тщательно изучен компонентный состав травы *Achillea millefolium* L. [4, 6, 10, 17, 27, 28, 37, 46, 55, 67, 68, 75, 77, 79, 82, 89, 96, 97, 104, 107, 109].

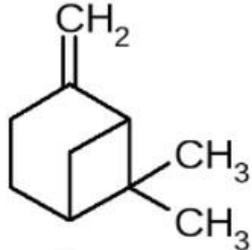
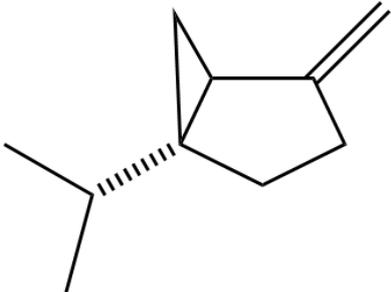
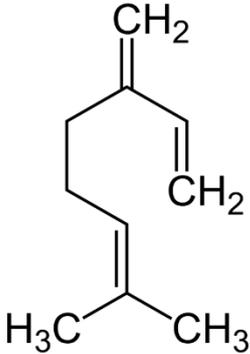
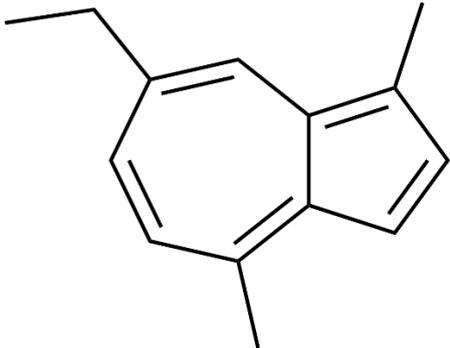
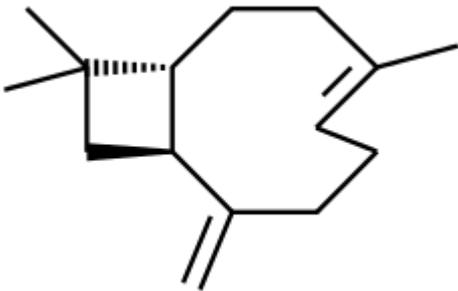
Одной из ведущих групп БАВ видов рода *Achilléa* L. являются эфирные масла [6, 8, 10, 27, 32, 33, 46, 52, 51, 53, 62, 65, 67, 68, 71, 77, 82, 89, 100, 107, 109]. В зависимости от географического расположения и экологических факторов компонентный состав эфирного масла может отличаться как качественно, так и количественно [6, 8, 10, 27, 32, 33, 46, 52, 51, 53, 62, 65, 67, 68, 71, 77, 82, 89, 100, 107, 109]. По результатам анализа эфирного масла отмечено сходство состава между родственными целевому лекарственному растению видами, а разница в наличии отдельных компонентов, вероятно,

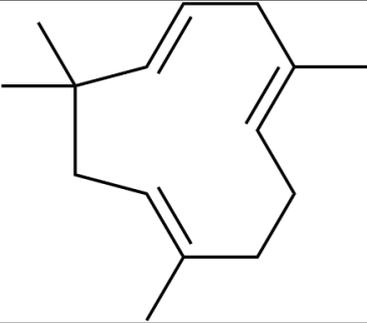
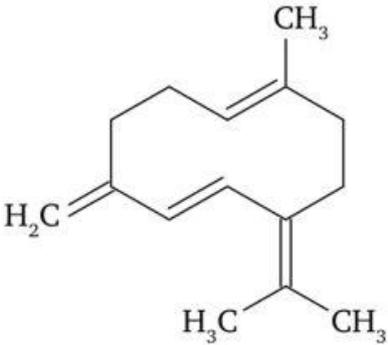
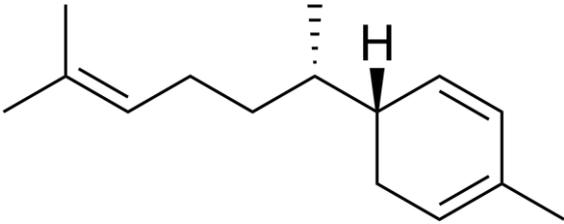
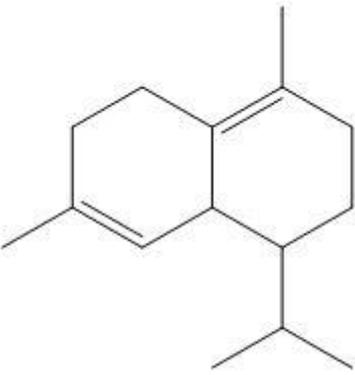
возникает не в связи с видовыми различиями, а с местом произрастания растений (эколого-географический фактор) или систематической неоднородностью вида [6, 8, 10, 27, 32, 33, 46, 52, 51, 53, 62, 65, 67, 68, 71, 77, 82, 89, 100, 107, 109].

Химический состав эфирного масла тысячелистника обыкновенного включает монотерпены и сесквитерпены [6, 8, 10, 27, 32, 33, 46, 52, 51, 53, 62, 65, 67, 68, 71, 77, 82, 89, 100, 107, 109]. Основным компонентом являются проазулены, в частности хамазулен, обуславливающий синий цвет эфирного масла (табл. 1) [6, 8, 10, 27, 32, 33, 46, 52, 51, 53, 62, 65, 67, 68, 71, 77, 82, 89, 100, 107, 109]. Содержание хамазулена в эфирном масле колеблется от следовых количеств до 50% в зависимости от места сбора сырья.

Таблица 1 – Основные химические соединения эфирного масла видов рода *Achilléa* L.

№ п/п	Соединение	Структурная формула	Брутто-формула
Монотерпены			
1.	1,8-цинеол		$C_{10}H_{18}O$
2.	α -Пинен		$C_{10}H_{16}$

3.	β -Пинен		$C_{10}H_{16}$
4.	Сабинен		$C_{10}H_{16}$
5.	β -Мирцен		$C_{10}H_{16}$
Сесквитерпены			
6.	Хамазулен		$C_{14}H_{16}$
7.	Кариофиллен		$C_{15}H_{24}$

8.	Гумулен		$C_{15}H_{24}$
9.	Гермакрен D		$C_{15}H_{24}$
10.	Зингиберен		$C_{15}H_{24}$
11.	δ -Кадинен		$C_{15}H_{24}$

В ходе сравнительного анализа эфирных масел тысячелистника обыкновенного и тысячелистника благородного флоры Сибири методом газожидкостной хроматографии, проведенного учеными Сибирского медицинского университета совместно с Институтом химических наук АН Республики Казахстан (Г.И. Калинкина, А.Д. Дембицкий, Т.П. Березовская), было обнаружено, что состав эфирных масел этих видов тысячелистника

содержит более 50 компонентов, среди которых идентифицировано 32 [27]. Различие в химическом составе эфирного масла *A.nobilis* в сравнении с составом эфирных масел *A.millefolium* и *A.asiatica* особенно заметно в содержании сесквитерпеноидов. Так, в эфирных маслах *A.millefolium* и *A.asiatica* преимущественно наличие монотерпеноидов, главным образом благодаря высокому содержанию β -пинена+сабинена (22,56–28,35%) и цинеола (5,21–12,78%). В эфирном масле *A.nobilis* больше 60% составляют сесквитерпеноиды, особенно γ -кадинен (46,72%) и α -кадинол (8,6%). При этом в сесквитерпеновой части отсутствуют углеводород гермакрен D и ряд спиртов, присутствующих в эфирных маслах двух других видов *Achillaea* L. Одним из интересных наблюдений для видов рода *Achillaea* L. является обнаружение учеными тимола и карвакрола в эфирном масле *A.nobilis*, а хамазулен присутствует в эфирном масле данного вида в следовых количествах [27].

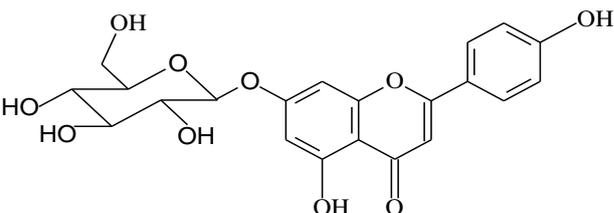
Исследователи из Сибирского медицинского университета, Новосибирского института органической химии имени Н.Н. Ворожцова СО РАН и Новосибирского государственного университета (М.С. Юсубов, Г.И. Калинкина, Л.А. Дрыгунова, Л.М. Покровский, Е.А. Королук, А.В. Ткачев) провели исследование травы тысячелистника обыкновенного и тысячелистника азиатского, собранных в различных районах Западной Сибири, с использованием метода хромато-масс-спектрометрии [68]. Обнаружено более 150 компонентов, из которых легко идентифицируются большинство основных компонентов, содержание которых в масле превышает 0,1%. Основными компонентами среди монотерпеноидов являются (%): α -пинен (3.6-8.0), сабинен (4.8-11.0), β -пинен (18.4-33.9), β -мирцен (0.5-5.2), 1,8-цинеол (3.7-12.1). Среди сесквитерпеноидов преобладают (%): кариофиллен (4.1-11.9), гумулен (0.6-1.6), гермакрен D (2.4-16.3), зингиберен (1.4-3.8), δ -кадинен (0.7-1.6), кариофиллен- α -оксид (0.4-2.2), хамазулен (2.5-18.0) [68].

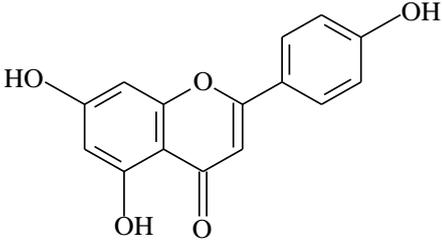
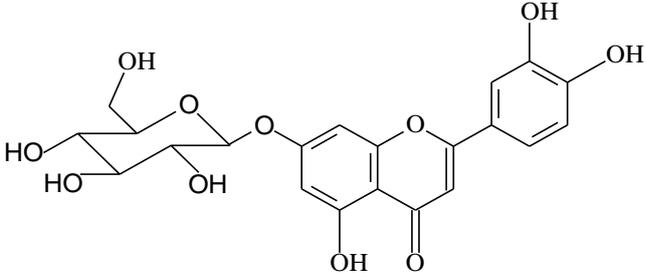
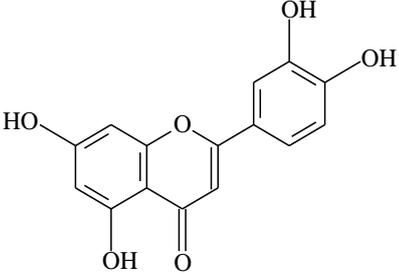
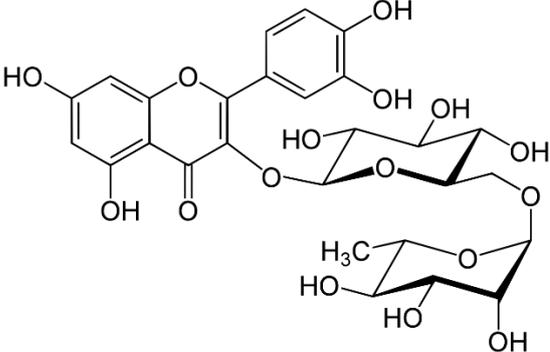
Кроме того, сотрудниками Института биологии Коми НЦ УрО РАН (Быкова Е.Е., Пунегов В.В., Мишуров В.П.) проводилось изучение

содержания и компонентного состава эфирного масла *Achillea millefolium* L. в условиях культуры [6]. При изучении эфирного масла было использовано сырьё тысячелистника обыкновенного разного географического происхождения: Москва (сорт Васюринский), Петрозаводск, Махачкала, Серпухов, Сыктывкар. Применение комбинированного подхода, включающего метод газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) и хромато-масс-спектрометрии, позволило раскрыть более 100 компонентов в составе эфирных масел изучаемых растений. Важно отметить, что из этих компонентов было успешно идентифицировано и определено химическое строение 60 терпеноидов. Основные компоненты среди монотерпеноидов (%): α -пинен (0.4-4.2), сабинен (2.7-18.1), β -пинен (0.6-12.0), 1,8-цинеол (8.0-34.5), транс-пинокарвеол (1.3-2.8), t-сабиненгидрат (1.1-5.5), камфора (0.9-3.8), борнеол (0.9-3.1). Среди сесквитерпеноидов преобладают (%): β -кариофиллен (3.2-4.6), гермакрен D (1.7-6.7), E, цис-эпи-бета-санталол (0.7-2.9), хамазулен (2.1-12.6) [6].

Второй ведущей группой БАС являются флавоноиды [2, 8, 10, 18, 19, 28, 29, 30, 31, 38, 40, 56, 80, 82, 95, 104, 108]. В совместных работах Витебского государственного медицинского университета и Всероссийского научно-исследовательского института лекарственных и ароматических растений описано выделение гликозидов апигенина (космосиин) и лютеолина (цинарозид) [28]. Кроме того, имеются результаты выделения рутина [29].

Таблица 2 – Основные флавоноиды видов рода *Achillea* L.

№ п/п	Соединение	Структурная формула	Брутто-формула
1.	Космосиин		$C_{21}H_{20}O_{10}$

2.	Апигенин		$C_{15}H_{10}O_5$
3.	Цинарозид		$C_{21}H_{20}O_{11}$
4.	Лютеолин		$C_{15}H_{10}O_6$
5.	Рутин		$C_{27}H_{30}O_{16}$

Сопутствующие вещества: фенолпропаноиды (хлорогеновая кислота, кофейная кислота), азотистые вещества (алкалоид бетоницин (метилбетаин, ахиллеин), бетаин, стахидрин, холин), витамин К₁, стерины (β-ситостерин, стигмастерин, кампестерин) [10, 17, 37, 38, 106].

1.3. Фармакологические свойства и область применения травы тысячелистника обыкновенного

1.3.1. Применение тысячелистника в народной и официальной медицине

Трава тысячелистника обыкновенного, ввиду содержания различных групп БАС, имеет целый ряд фармакологических свойств. Как уже упоминалось ранее, тысячелистник обыкновенный применяется в народной и официальной медицине с древних времен. Например, по одной из версий название *Achilléa* происходит от имени древнегреческого героя Ахиллеса (Ахилла) [21, 47, 48, 49, 59, 82, 83]. Ахиллес является одним из главных героев «Илиады» Гомера, демонстрируя «модель того, как мужчина переходит от юности к зрелости». Долгое время Ахиллес был известен лишь как герой древнегреческого эпоса, в частности, как главный персонаж "Илиады" Гомера. Исследования, связанные с происхождением этого образа, в основном сосредоточены на теории о возникновении древнегреческого героического эпоса. Однако недавно была проведена реконструкция мифологического образа Ахиллеса в качестве божественного существа, что открыло новые перспективы для исследования роли этого божественного образа в общей мифологической системе Древней Греции. Ахиллес служил вдохновением для множества политиков и воинов в древности, включая Александра Македонского. Веками его развитие рассматривалось как пример аристократического обучения и воспитания для тех, кто судьбой обречен быть первыми и лучшими. В дополнение к описанию героических подвигов Ахиллеса во взрослом возрасте, сохранилось множество деталей его детства и юности, в которых предначертано, что он станет идеальным героем, обладающим божественной защитой от всех трудностей и испытаний. Исследование истории обучения и воспитания Ахиллеса осложнено разнообразием и противоречивостью сказаний о его детстве, однако главным является наличие в этой истории двух наставников: «божественного» – кентавра Хирона (который обучил Ахиллеса всему «необычному»), и

«человеческого» – учителя-грека по имени Феникс, «достаточно знатного, но зависимого от отца мальчика» (который обучил Ахиллеса «земным» вещам)» [21, 47, 48, 49, 59, 82, 83].

Текстовые традиции и визуальные традиции, представлявшие ученические пути Ахиллеса, подчёркивают, что именно Хирон сделал медицинское знание значимой частью учебной программы. Данный факт неоднократно подтверждается упоминаниями, как Ахиллес использовал свои познания уже в зрелом возрасте в период Троянской войны (например, краснофигурный килик ок. 500 г. до н.э. с изображением, где Ахиллес перевязывает руку Патроклу; также отдельные эпизоды описываются и у Гомера в «Иллиаде» [24]). Отмечено, что Ахиллес использовал тысячелистник в сочетании с пчелиным воском и медом в качестве припарки для остановки кровотечения и для лечения ран у своих солдат. От данного же мифа происходит и второе название – «солдатская трава» (soldier's woundwort) [21, 47, 48, 49, 59, 82, 83].

Некоторые учёные считают, что название растения образовано от греч. *chilos* (трава, корм) или *chilioi* (тысяча), что характеризует многократно рассеченные листья растения [47, 59].

Кроме того, есть и иные упоминания использования тысячелистника в Древней Греции. Например, древнегреческий военный врач, фармаколог и натуралист Диоскорид применял тысячелистник при дизентерии, связанной с холерой или иными причинами [103].

В персидской традиционной литературе растения рода Тысячелистник (более известны под названием *Bumadaran*) представлены как тонизирующее, противовоспалительное, спазмолитическое, потогонное, мочегонное и эменагогенное (стимулирующее кровообращение в области малого таза) средство и используются для лечения кровотечений, пневмонии, ревматических болей и заживления ран [103].

В трактатах Абу Али ибн Сино (Авиценны) также описано использование тысячелистника обыкновенного [1]. Согласно древней

медицине, тысячелистник определен как натура горячая во II степени, иногда - как горячая в III степени. Ему приписывают способность смягчать, разжижать скопления, стимулировать выведение мочи и менструаций, а также растворять и выводить почечные камни. Он также считался полезным при различных заболеваниях матки и способствовал ее очищению. Однако древние целители рекомендовали исключить масло и жиры из рациона во время употребления тысячелистника [1].

В испаноязычных районах Нью-Мексико и южного Колорадо тысячелистник называют *plumajillo*, или "маленькое перо", из-за формы листьев [82, 103]. Коренные народы США и первые поселенцы использовали тысячелистник благодаря его вяжущим свойствам, которые делают его эффективным средством для заживления ран и борьбы с кровотечениями [82, 103].

Виды *Achillaea* L. являются наиболее важными местными хозяйственными растениями Турции. Травяные чаи, приготовленные из некоторых видов *Achillea* L., традиционно используются в Турции при болях в животе и метеоризме [103].

С точки зрения китайской медицины, растения рода *Achillaea* L. обладают тремя основными действиями: «очищает Внешний Ветер от Ветра-Жара» (потогонное, жаропонижающее), «устраняет дефицит тонуса» (тонизирующее) и «очищает Флегму сердца» (антигипертензивное) [103].

В русской народной медицине траву тысячелистника применяют как горечь, кровоостанавливающее (отсюда и названия «порезник», «кровавая трава» [1, 47, 59]), противовоспалительное, успокаивающее средство. Кашицу свежей травы прикладывают на свежие раны. Отвар тысячелистника пьют при болезненных месячных. Клизмы горячим настоем травы применяют при лечении геморроя [1].

Многие из этих фармакологических действий были подтверждены экспериментальными и клиническими исследованиями. Тем не менее, следует отметить и неизвестные аспекты применения растений рода *Achillaea* L.,

которые исследуются в настоящее время и требуют более пристального внимания.

В современной медицине тысячелистник обыкновенный применяется как горечь возбуждающую аппетит, желчегонное, гепатопротекторное, кровоостанавливающее средство [36, 38, 39, 65, 70, 75, 79, 87, 88, 96, 97, 99, 103, 104]. Травя тысячелистника может использоваться как самостоятельно, так и являться одним из компонентов в различных сборах и препаратах [38, 39]. Также, по данным различных учёных, извлечения из травы тысячелистника проявляют антимикробную активность в отношении ряда грамположительных и грамотрицательных бактерий [8, 32, 33, 44, 65, 69, 73, 85, 87, 90, 104, 107, 110, 111]. Кроме того, имеются результаты по исследованиям антиоксидантной активности травы тысячелистника [6, 60, 65, 73, 75, 78, 84, 85, 89, 92, 104, 105, 110, 113].

1.3.2. Применение тысячелистника в немедицинских целях

Тысячелистник активно используется в ландшафтном дизайне в связи с наличием большого количества сортов и гибридов, имеющих разнообразную окраску соцветий [42].

В декоративном садоводстве используется несколько видов тысячелистника, однако это не исключает включения в ландшафтные композиции самого тысячелистника обыкновенного. В европейских странах сорта представлены в основном тетраплоидами. В нашей стране выведен сорт Васюринский [42].

Гадание по И-цзину (“Книга перемен”) на стеблях тысячелистника является одним из древнейших способов гадания в Древнем Китае [25]. Данный способ пришёл на замену гаданию на панцирях черепахи. Процесс гадания описан в одном из разделов “Книги перемен” – «Комментарии к присоединенным изречениям» (“Си цы чжуань”) [25].

Встречается использование тысячелистника и в парфюмерии. Его относят к травянистым, фужерным нотам. Чаще всего тысячелистник встречается в нишевых ароматах.

В последние годы в Европе сохраняется тенденция использования в пище дикорастущих растений [42]. В частности, тысячелистник рекомендуется добавлять в мелконарезанном виде в салат, на бутерброд с маслом; также тысячелистник хорошо сочетается со сваренными вкрутую яйцами, творогом, рекомендуется для приготовления соусов с травами. В Швеции в древние времена тысячелистник использовался для приготовления пива [42].

Также тысячелистник обладает инсектицидными свойствами, поэтому некоторые садоводы и огородники применяют данное растение для уничтожения таких насекомых как тля, паутинные клещи, трипсы [42].

1.4. Вопросы стандартизации травы *A. millefolium* L.

В Государственной фармакопее Украины, ГФ Республики Беларусь и ГФ Республики Казахстан, а также в Британской и Европейской фармакопеех предполагается анализ содержания масла эфирного и проазуленов [12, 13, 16, 81, 86]. Методики определения флавоноидов при этом отсутствуют. В США *Achillea millefolium* L. включён только в Американскую травяную фармакопею, фитохимический анализ отсутствует [74].

На текущий момент в ГФ РФ XIV издания включена ФС.2.5.0101.18 «Тысячелистника обыкновенного трава» [11]. Анализ основных групп БАВ подразумевает применение в качестве стандарта Судана III, хроматографическая система толуол – этилацетат (95:5); детекция – раствор спиртовой серноокислый анисового альдегида [11]. В связи с тем, что Судан III не входит в химический состав сырья, является актуальной разработка методики определения подлинности с использованием образцов флавоноидов.

Кроме того, актуальны вопросы количественного анализа. Согласно литературным данным, для тысячелистника описано несколько методик определения суммы флавоноидов. Методика, разработанная О.В. Евдокимовой, подразумевает использование на стадии экстракции этанола 96%, содержащего концентрированную 1% HCl. Стадия экстракции

проводится в течение 1,5 ч. Предполагается определение содержания суммы флавоноидов в пересчёте на лютеолин методом спектрофотометрии [19, 20].

Методика, разработанная Н.А. Дьяковой, отличается незначительно: в качестве экстрагента используется спирт этиловый 96%, экстракция проводится в течение 45 минут, содержание суммы флавоноидов проводится в пересчёте на рутин [18].

Вопросы использования методики определения суммы флавоноидов в качестве количественного метода анализа поднимаются и за рубежом. На данный момент Государственные фармакопеи Казахстана, Республики Беларусь, Британии, Украины и Европейская фармакопея предлагают стандартизировать тысячелистника траву лишь по содержанию эфирного масла [12, 13, 16, 81, 86]. Учёные Белорусского государственного медицинского университета предлагают использовать в качестве экстрагента 80% метанол и смесь растворителей (пропанол-2 – 20%; диметилсульфоксид (ДМСО) – 30%; вода – 50%). Экстракцию проводили на водяной бане в плотно закупоренных флаконах с завинчивающейся крышкой в течение 60 мин при 80°C, если в качестве экстрагента выступал 80% метанол, и при 100°C, если экстрагентом являлась вышеупомянутая смесь растворителей. Содержание флавоноидов определяли спектрофотометрически в пересчёте на лютеолин-7-О-глюкозид (цинарозид) [30, 31].

Также к методикам количественного определения относится определение эфирного масла. По методике из в ГФ РФ XIV издания определение количества эфирного масла производят по разнице между объемом раствора эфирного масла в декалине и объемом самого декалина [11].

В процессе анализа химического состава эфирного масла, учеными были предложены разнообразные инструментальные методики анализа, которые были описаны ранее [6, 27, 32, 33, 46, 51, 52, 53, 65, 68, 71, 89].

Учитывая разнообразие подходов к качественному и количественному определению БАВ в траве тысячелистника обыкновенного и возможные

противоречия между ними, важно продолжить исследования в этой области, с углубленным изучением состава флавоноидов в сырье данного растения.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

1. По результатам скрининга литературных данных обнаружена высокая полиморфность многих видов рода *Achillea* L., их слабая разграниченность по большинству диагностических признаков. Таким образом, является актуальным продолжение анатомо-морфологических исследований для выявления наиболее специфичных признаков.

2. Элементный химсостав травы тысячелистника обыкновенного представлен 2 группами БАВ – эфирное масло и флавоноиды. Химический состав эфирного масла тысячелистника обыкновенного включает монотерпены и сесквитерпены. Основным компонентом являются проазулены, в частности хамазулен, обуславливающий синий цвет эфирного масла. К флавоноидам относятся гликозиды апигенина (космосиин) и лютеолина (цинарозид); также содержатся рутин, кактицин. К сопутствующим веществам относятся фенилпропаноиды (производные хлорогеновой кислоты), азотистые вещества (алкалоид бетоницин (метилбетаин, ахиллеин), бетаин, стахидрин, холин), витамин К₁, стерины (β -ситостерин, стигмастерин, кампестерин).

3. Трава тысячелистника обыкновенного содержит ряд фармакологических свойств, а именно: горечь для возбуждения аппетита, желчегонное, гепатопротекторное, кровоостанавливающее, противовоспалительное, антимикробное, антиоксидантное.

4. Несмотря на то, что трава тысячелистника обыкновенного присутствует в ГФ РФ XIV издания, исследования в плане совершенствования существующих методик не теряют своей актуальности. Описанный в качестве стандарта Судан III не входит в состав сырья, таким образом является целесообразной разработкой методики определения одной из основных групп БАВ – флавоноидов. Среди методик определения суммы

флавоноидов наблюдается противоречивость в связи с использованием различных друг от друга параметров, следовательно, является актуальным совершенствование методики количественного анализа.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И ПРИМЕНЯЕМЫЕ МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объекты исследования

В рамках выполнения диссертационной работы была исследована надземная часть (трава) видов рода *Achillea* L., растущих на территории Самарской области, Оренбургской области и Республики Татарстан, а также промышленные образцы фармакопейного сырья (табл. 3).

Таблица 3 – Изучаемые виды рода *Achillea* L.

№ п/п	Вид	Заготовленная часть растения	Год сбора	Место сбора
1.	Тысячелистник обыкновенный (<i>Achillea millefolium</i> L.)	Трава	2020-2023	Самарская область
		Трава	2021-2022	Оренбургская область
		Трава	2021-2022	Республика Татарстан
		Измельченная трава 50 г	2019-2023	АО «Красногорсклексредства»
		Фильтр-пакеты 20 шт	2019-2023	АО «Красногорсклексредства»
2.	Тысячелистник благородный (<i>Achillea nobilis</i> L.)	Трава	2021-2023	Самарская область
3.	Тысячелистник хрящватый (<i>Achillea cartilaginea</i> Ledeb. ex Rchb.)	Трава	2021-2023	Самарская область

Сбор сырья осуществлён в период массового цветения и плодоношения (июнь-август).

Образцы и индивидуальные субстанции, которые были отобраны для анализов:

- водно-спитовые извлечения из травы тысячелистника разных видов различных концентраций спирта;
- густой экстракт травы тысячелистника обыкновенного;
- эфирное масло из *Achillra millefolium*;
- выделенные соединения: апигенин, космосиин, цинарозид, лютеолин, рутин, кверцетин, кемпферол, хлорогеновая кислота, кофейная кислота.

2.2. Материалы, приборы и реактивы, использованные в работе

В рамках диссертационной работы отобраны следующие приборы:

- весы аптечные для сыпучих материалов (ВСМ-1, ВСМ-5, ВСМ-20);
- весы аналитические «Metler Toledo XS 204»;
- плитка электрическая Skyline DP-45B (Kromax Group Co.Ltd., Швеция);
- спектрофотометр «Specord 40» (Germany, Analytik Jena AG).
- роторный испаритель «Labtex ИП-1 ЛТ» (Лабтех, РФ);
- высокоэффективный жидкостной хроматограф «МАЭСТРО ВЭЖХ» (ООО «Интерлаб», РФ);
- Микроскоп световой «Motic DM-1802» (кратность увеличения: 4x10, 10x10; 40x10, 100x10);
- Микроскоп световой «Motic DM - 39C - N9GO – А»;
- Микроскоп поляризационный учебный ПЛМ-213 (кратность увеличения 40x – 630x, компенсаторы пластинки λ , источник света лампа галогеновая 6В, 20 Вт).

Реактивы и материалы, которые были отобраны для анализов:

- пластины хроматографические марки «Sorbfil» типа ПТСХ-АФ-А-УФ (ООО «ИМИД», Россия);
- силикагель КСК 50/100 мкм (ТУ 6-09-39-23-86, ООО «ИМИД»);
- ацетонитрил для ВЭЖХ (ТУ СОМР 3-074-06, ООО «Компонент-Реактив», Россия);
- хлороформ ХЧ (ТУ СОМР 2-028-06, ООО «Компонент-Реактив», Россия);
- спирт этиловый медицинский 96% ХЧ.

2.3. Характеристика методов исследования

2.3.1. Методы проведения морфолого-анатомического анализа

Микроскопический анализ проведен с помощью методов световой микроскопии в проходящем и отраженном свете и поляризационной микроскопии. Пробоподготовка образцов, приготовление микропрепаратов, а также техника проведения микроскопического исследования были осуществлены в соответствии с требованиями ГФ РФ издания XIV, а именно ОФС.1.5.3.003.15 [11].

2.3.3. Анализ методами хроматографии

1. Тонкослойная хроматография (ТСХ).

Для определения основных групп БАВ в водно-спиртовых извлечениях из травы видов рода *Achillea* L. выбрана тонкослойная хроматография [11, 23].

Первоначально размещали хроматографические пластинки в шкаф сушильный для удаления влаги (100-105°C). На линию старта капиллярами размещали 0,02 мл анализируемого извлечения и рядом 0,01 мл 0,02% раствора СО флавоноидов: рутин, кемпферол, кверцетин, цинарозид, лютеолин. Затем в камеру для проведения тонкослойной хроматографии (первоначально насыщена парами системы растворителей не менее 24 часов) разместили пластинку. При достижении фронта элюэнта уровня 1-1,5 см от верхнего края, пластинка извлекается из камеры; исследование считается завершенным.

С целью определения оптимальных условий качественного определения состава БАВ в траве тысячелистника задействованы следующие системы:

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

После полного высушивания первоначально осуществляется детекция в видимом свете; далее задействован УФ-свет при $\lambda=254$ и $\lambda=365$ нм. После этого наносили 3% спиртовой раствор $AlCl_3$, раствор диазобензолсульфокислоты в щелочной среде.

2. Колоночная хроматография.

Для изолирования веществ, содержащихся в сырье, была применена колоночная хроматография на силикагеле с использованием материала КСК 50/100 мкм (Россия), после чего производилась их перекристаллизация. Для определения чистоты веществ использовались физико-химическими константами и УФ-спектроскопией.

3. Высокоэффективная жидкосная хроматография (ВЭЖХ).

Хроматографический анализ проводили методом обращенно-фазовой хроматографии (градиентный режим). Прибор – жидкостной хроматограф высокоэффективный «МАЭСТРО ВЭЖХ», ООО «Интерлаб» (колонка ВЭЖХ Ультра 150 мм x 3 мм; C18 5 мкм). Температура колонки поддерживалась при 30°C. Элюэнт: система ацетонитрил (ПФА) – 1% р-р уксусной кислоты (ПФБ), скорость элюирования – 1 мл/мин. Детектирование соединений проводили при $\lambda=340$ нм. Объем вводимой пробы – 10 мкл. Градиентный профиль представлен в таблице 4.

Таблица 4 – Профиль градиента хроматографического разделения

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

2.3.4. Физико-химические методы анализа

Спектрофотометрия. Спектральная регистрация определялась при помощи спектрофотометра «Specord 40» в кюветах с $l=10$ мм; рабочий диапазон $\lambda=190-500$ нм. Раствор сравнения – этиловый спирт 96%.

ЯМР-спектроскопия и масс-спектрометрия. С целью идентификации веществ, извлеченных из *Achillea millefolium*, их характеристики определяли путем регистрации ^1H -ЯМР-спектров (на приборе «JNM-ECX 400» (399.78 МГц) и ^{13}C -ЯМР-спектров (на приборе «JNM-ECX 400» (100.52 МГц).

Для регистрации масс-спектров высокого разрешения был использован прибор «Bruker micrOTOF II». В качестве метода выбрана электрораспылительная ионизация (ESI). Измерения выполнены на положительных ионах (напряжение на капилляре – 4500 V). Диапазон сканирования масс – m/z 50 – 3000, калибровка — внешняя или внутренняя (Electrospray Calibrant Solution, Fluka). Применялся шприцевой ввод вещества для растворов в метаноле, скорость потока составляла 3 мкл/мин. В качестве газа-распылителя использован азот (4 л/мин), температура интерфейса – 180°C.

2.3.5. Технологические методы анализа

С целью получения и дальнейшего анализа экстракта густого тысячелистника нами был предварительно получен жидкий экстракт. Экстракт жидкий получен методом дробной модифицированной мацерации в соотношении «сырье-этанол 70%-й» 1:1; мацерацию проводили в течение 6

дней. Очистку полученной вытяжки проводили путём отстаивания в температурном режиме не выше 10°C в течении 2 суток с дальнейшей фильтрацией. Конечный продукт получали путем упаривания из жидкого экстракта на водной бане $T = 100^{\circ}\text{C}$.

2.3.6. Фармакологические методы анализа

В рамках настоящей диссертационной работы определяли диуретический и нейротропное действия густого экстракта травы тысячелистника обыкновенного, а также выделенных индивидуальных веществ – апигенина, космосиина, лютеолина и цинарозида. Была исследована также острая токсичность образцов.

Анализ фармакологических эффектов определялся на белых беспородных крысах обоего пола, $m=200-220$ г. Животные размещались в виварии, рацион обычный, не ограничен доступ к воде. Животные были поделены на группы: 1) группа, которой вводили образцы для анализа; 2) контролируемая группа; 3) группа с препаратом сравнения. Методом случайного отбора путем жеребьевки формировали контрольные и опытные группы. Образцы изучения вводились внутрижелудочно с помощью зонда [22]. Суммарно проведено 8 серий экспериментов – 5 опытных и 3 контрольных (10 животных в каждой серии). Статистическая обработка полученных параметров проводилась с применением стандартных методов вариационной статистики при помощи программ Microsoft Excel 2019 «Пакет анализа» и Statistica 10.0 по критерию Манна – Уитни с поправкой Бонферрони.

Диуретическая активность

Первоначально, за 24 ч перед экспериментом, животные получали вводную нагрузку внутрижелудочно в объеме 3% от массы тела. В день анализа животным группы контроля аналогично давали внутрижелудочно волную нагрузку. Опытные животные внутрижелудочно получали анализируемые образцы в эквивалентном объеме воды. Густой экстракт дан в дозе 10 мг/кг, БАВ – в дозе 1 мг/кг.

Препарат сравнения: фуросемид в пороговой дозе 1 мг/кг (препарат сравнения для 4-х Ч опытов) и гипотиазид в эффективной средней терапевтической дозе 20 мг/кг (препарат сравнения для 24-х Ч опытов).

Животных размещали в обменные клетки на 24 ч. Собранные порции мочи по истечении 4 и 24 ч подвергали анализу. Измеряли почечную экскрецию воды, а также концентрацию креатинина колориметрическим методом на фотоколориметре КФК-3.

Нейротропная активность

Анализ нейротропной активности экстракта густого травы тысячелистника обыкновенного и индивидуальных соединений проводили с использованием теста Порсолта [26, 64]. Данный тест предусматривает оценку двигательной активности крыс, помещенных в стеклянный цилиндр диаметром 20 см и высотой 40 см, на 1/3 заполненный водой с температурой 27 ± 1 °С. Животное помещали в цилиндр на 5 мин, регистрировали время активного и пассивного плавания, время иммобилизации. Увеличение времени активного плавания и уменьшение времени иммобилизации рассматривали как антидепрессантный эффект. Тест проводили спустя 2 ч после введения густого экстракта и БАС.

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

Исследование микробиологической активности

В эксперименте задействованы следующие тест-культуры: *Burkholderia cenocepaci* (шт. 105, 136), *Burkholderia multivoran* (шт. 139, 141), *Pseudomona aeruginosa* (шт. 799).

Для проведения скринингового анализа антимикробной активности извлечено эфирное масло по методу 3 [11]; кроме того, были выделены экстракты жидкие из *Achillea millefolium* различных концентраций по классической технологии.

Минимальную ингибирующую концентрацию определяли путём метода двойных серийных разведений в бульоне (в соответствии с МУК 4.2.1890-04) [45].

Скрининговый анализ антимикробного эффекта проведен на кафедре общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.

Исследование острой токсичности

Определение проводилось в соответствии с требованиями ГОСТ 32296-2013 «Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при внутрижелудочном поступлении методом фиксированной дозы». Сформировали опытную и контрольную группы лабораторных крыс обоего пола, по десять в каждой. Внутрижелудочным зондом анализируемой группе давали экстракт густой (1 г/кг) на фоне 3% водной нагрузки; группа контроля получала воду очищенную в тех же условиях. В 1 день эксперимента проводилось постоянное наблюдение за животными 2 групп. Общая длительность проведения эксперимента – 14 дней. С учетом результатов наблюдений за животными определяли класс токсичности.

Исследования проводили на кафедре фармакологии имени ЗДН РФ, профессора А. А. Лебедева ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.

ГЛАВА 3. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАТОМО-ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВИДОВ РОДА ТЫСЯЧЕЛИСТНИК

Наряду с тысячелистником обыкновенным, широко встречаются и другие виды рода *Achillea* L., среди которых наиболее часто встречаются тысячелистник хрящеватый (*Achillea cartilaginea* Ledeb. ex Rchb.) и тысячелистник благородный (*Achillea nobilis* L.).

На сегодняшний день вопрос диагностики примесных видов рода *Achillea* L., являющихся близкородственными к целевому лекарственному растению, остаётся нерешённым. Проведение обзора нормативной документации, которая определяет требования к качеству сырья тысячелистника обыкновенного, позволило выявить ряд недостатков, которые мешают обеспечить эффективный контроль за его подлинностью. Необходимо отметить, что тысячелистник обыкновенный присутствует в Государственной фармакопее не только в РФ, но и ряде других стран. Так, трава тысячелистника обыкновенного имеет частные фармакопейные статьи в немецкой, французской, британской фармакопеех, а также в Американской травяной фармакопее [35, 74]. Кроме того, данный вид сырья входит в фармакопее стран бывшего СССР, таких как Казахстан, Беларусь и Украина [12, 13, 16].

Существует проблема разночтений описанных признаков для травы тысячелистника обыкновенного. Так, в Европейской фармакопее, Государственной фармакопее Украины, Государственной фармакопее Республики Казахстан, а также в Американской Травяной Фармакопее приведено и описано наличие такого признака, как тонко заостренных беловатых кончиков линейных долек листа [13, 16, 74, 86], в то время как в Государственной фармакопее Республики Беларусь и Государственной фармакопее Российской Федерации данный признак не приводится [11, 12].

В классике ботаники для определения специфики вида руководствуются совокупностью признаков, составляющих ключ определения, таких как: тип листа и степень его изрезанности, наличие/отсутствие конечных долек листа (так называемых «шипиков»), тип соцветия, тип цветков в соцветии, размеры

листочков обёртки и др. Также следует подчеркнуть, что многие признаки, отнесенные к селективным, из определителей в фармакопейном анализе сырья данного вида растения по неизвестной причине не применяются [34, 41, 61, 63].

В рамках выполнения настоящей диссертационной работы была исследована надземная часть (трава) видов рода *Achillea* L., растущих на территории Самарской области, Оренбургской области, Республики Татарстан. Сбор сырья осуществлён в период массового цветения растения (июнь-август 2019-2023 гг.). Также использовались промышленные образцы фасованного сырья тысячелистника обыкновенного. Видовая специфичность подтверждалась с применением справочной литературы [34, 41, 61, 63], а также с использованием Цифрового Гербарного фонда Московского государственного университета [58].

С целью проведения анатомо-морфологического анализа использованы в работе следующие микроскопы:

- Микроскоп световой «Motic DM – 1802»;
- Микроскоп световой «Motic DM-39C-N9GO-A»;
- Поляризационный микроскоп ПЛМ-213.

С целью оцифровки результатов анализа применена программа «Motic Images Plus 2.0 ML» (PC&Mac) 1301100100224/001 20111017; DM1102-10250-00-09820.

Подготовка и детекция микропрепаратов осуществлялись согласно ОФС.1.5.3.0003.15 ГФ РФ XIV издания «Техника микроскопического и микрхимического исследования ЛРС и ЛРП» [11]. По выявленным признакам проведена валидация согласно ОФС 1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» по показателям, применимым для морфолого-анатомического анализа, а именно – «Правильность», «Прецизионность», «Устойчивость» [11].

В настоящее время в ФС 2.5.0101.18 «Тысячелистника обыкновенного трава» ГФ РФ XIV издания предложены следующие морфологические и гистологические параметры:

- эпидермис из удлинённых клеток с извилистыми стенками и складчатой кутикулой;
- устьица аномоцитного типа с 4-5 околоустьичными клетками;
- многочисленные простые волоски, состоящие из 4-7 коротких тонкостенных клеток, лежащих в основании, и очень длинной конечной, слегка извилистой клетки с узкой нитевидной полостью, часто обломанной;
- эфиромасличные железки овальной формы с поперечной перегородкой, состоящие из 8 (6) выделительных клеток, расположенных в 2 ряда и 3-4 яруса;
- жилки сопровождаются секреторными ходами с желтовато-коричневым зернистым или маслянистым содержимым;
- трубчатые и язычковые цветки или их фрагменты с эпидермисом из клеток с извилистыми стенками или сосочковидными выростами (бугорчатый эпидермис), эфиромасличными железками, волосками, мелкими друзами оксалата кальция;
- фрагменты листочков обертки, состоящие из узких удлинённых клеток с утолщёнными пористыми стенками и секреторным ходом вдоль центральной жилки;
- фрагменты стебля с теми же диагностическими признаками, что и у листьев (тип устьичного аппарата, волоски, железки);
- шиповатые пыльцевые зерна.

Однако литературные данные показывают, что перечисленные признаки имеют сходство не только внутри рода *Achilléa* L., но и внутри семейства *Asteraceae* в целом. Для подтверждения данной гипотезы был проведён сравнительный гистологический анализ травы тысячелистника трёх видов – обыкновенного, хрящеватого, благородного.

Тысячелистник обыкновенный	1104 ±1,8	25±0,85	48±0,8	31±0,7	78±1,4	42±1,1	46±1,8	23±1,5
Тысячелистник хрящеватый	1128 ±1,2	23±0,9	0	27±1,3	78±1,7	50±1,7	10±1,6	18±1,4
Тысячелистник благородный	1117 ±1,3	20±1,25	89±1,6	25±1,5	64±1,3	50±1,6	43±2,2	21±1,4

Отметим, что по данным признакам возможно отличить тысячелистник хрящеватый ввиду того, что наличие простых волосков наблюдалось только у растений этого вида на нижней стороне листа.

Следовательно, описанные в литературе микроскопические признаки не позволяют достоверно отличить целевое сырьё от близкородственных видов.

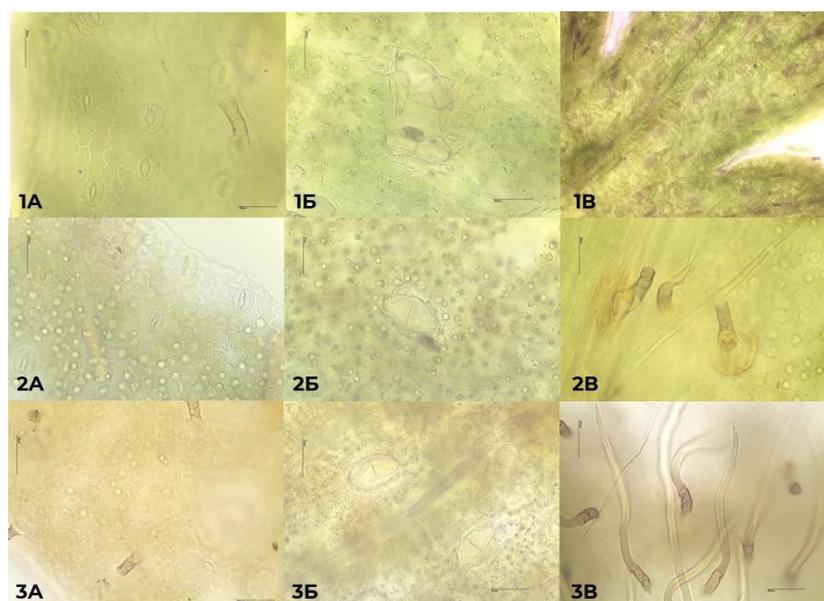


Рисунок 5 – Сравнительный гистологический анализ видов рода Тысячелистник

Обозначения: 1 – Тысячелистник обыкновенный: А – устьичный аппарат; Б – эфиромасличные желёзки; В – простые бичевидные волоски.

2 – Тысячелистник хрящеватый: А – устьичный аппарат; Б – эфиромасличные желёзки; В – простые бичевидные волоски.

3 – Тысячелистник благородный: А – устьичный аппарат; Б – эфиромасличные желёзки; В – простые бичевидные волоски.

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 обёрток элементарных соцветий корзинка;
- Шипики края листовой пластинки;
- Структура пыльцы.

Согласно особенностям заготовки фармакопейного сырья тысячелистника обыкновенного, известно, что заготовке пойдёт верхушка растения до 15 см, собранная в фазу цветения [11]. По требованиям частной фармакопейной статьи, для измельченного сырья допускаются кусочки листьев, стеблей, цветочных корзинок и отдельные цветки, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, что не приводит к деструкции большинства элементарных соцветий корзинка. Этот факт позволяет использовать ряд морфологических особенностей соцветий корзинка при оценке подлинности травы тысячелистника обыкновенного (рис. 6).



Рисунок 6 – Измельченное сырье травы тысячелистника обыкновенного

Обозначения: 1 – Измельченное сырье травы тысячелистника обыкновенного; 2 – Элементарное соцветие корзинка (x40).

Необходимо отметить, что в ряде случаев в фундаментальной ботанике для отличия близкородственных видов семейства *Asteraceae* используют значение числа трубчатых и язычковых цветков в элементарных соцветиях корзинка. Данный признак не применяется для диагностики видов рода *Achilléa* L. в фармакопейном анализе, однако используется в процессе таксономического определения вида в общей ботанике [34, 41, 57, 61, 63].

В целях изучения диагностичности указанного признака с достоверно известных особей трёх видов (обыкновенного, хрящеватого и благородного) отбирались соцветия корзинка каждого вида в числе 10 шт. Каждое соцветие препарировалось. Число трубчатых и язычковых цветков подсчитывалось вручную (рис. 7).

В целом встречаемость цветков в элементарном соцветии нестабильно 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.

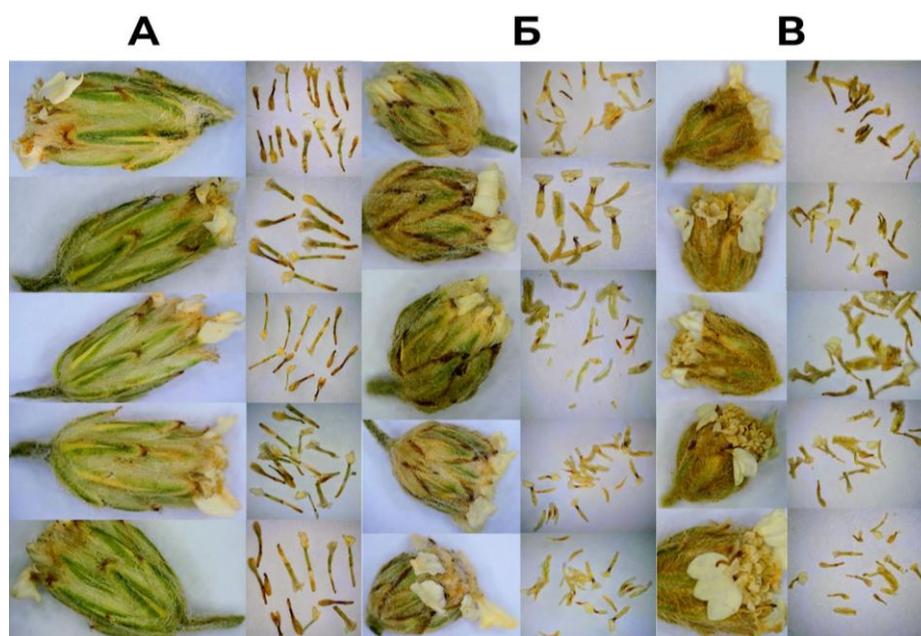


Рисунок 7 – Статистическая обработка признака «Количество цветков в элементарном соцветии корзинка»:

Обозначения: *A* – тысячелистник обыкновенный; *Б* – тысячелистник хрящеватый; *В* – тысячелистник благородный

Полученные данные выборки по каждому виду подвергали математической обработке с определением среднего числа цветков и стандартного отклонения выборки. Результаты определения средних чисел встречаемости представлены в гистограмме (рис. 8) и других показателях корреляции (табл. 6-8).

Таблица 6 – Статистические параметры «Кол-во цветков в элементарном соцветии корзинка» в траве тысячелисника обыкновенного

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>n</i>	15	10	12	14	12	10	15	13	11	12
<i>Образец</i>	<i>f</i>	<i>X_{ср}</i>	<i>S</i>	<i>P, %</i>	<i>t (P,f)</i>		ΔX		<i>E, %</i>	
Количество цветков в элементарном соцветии корзинка	10	12,40	1,84	95	2,23		±1,3135		±10,59	

Таблица 7 – Статистические параметры «Кол-во цветков в элементарном соцветии корзинка» в траве тысячелисника хрящеватого

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>n</i>	18	11	20	21	19	15	18	20	17	20
<i>Образец</i>	<i>f</i>	<i>X_{ср}</i>	<i>S</i>	<i>P, %</i>	<i>t (P,f)</i>		ΔX		<i>E, %</i>	
Количество цветков в элементарном соцветии корзинка	10	17,90	3,00	95	2,23		±2,1427		±11,97	

Таблица 8 – Статистические параметры «Кол-во цветков в элементарном соцветии корзинка» в траве тысячелисника благородного

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>n</i>	14	15	16	13	14	17	15	16	14	16
<i>Образец</i>	<i>f</i>	<i>X_{ср}</i>	<i>S</i>	<i>P, %</i>	<i>t (P,f)</i>		ΔX		<i>E, %</i>	
Количество цветков в элементарном соцветии корзинка	10	15,00	1,25	95	2,23		±0,8913		±5,94	

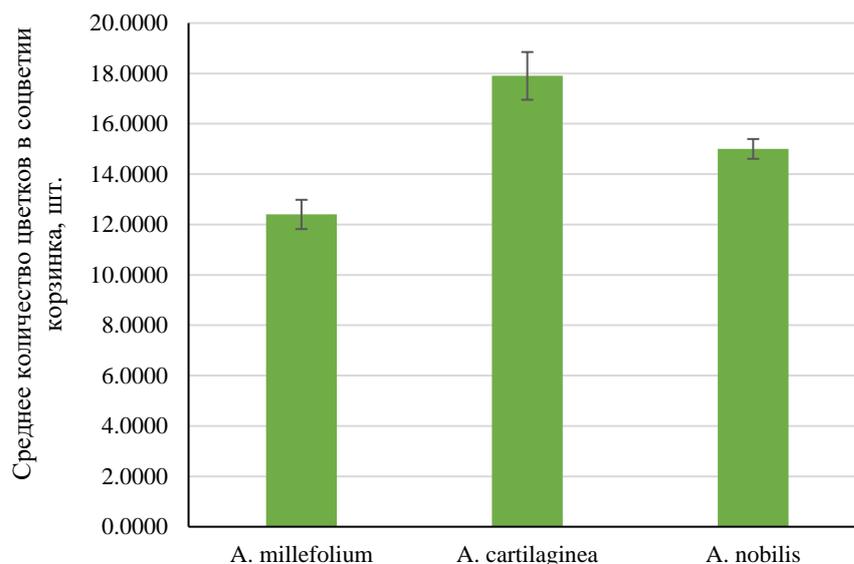


Рисунок 8 – Гистограмма сравнения признака «Среднее количество цветков в соцветии корзинка» некоторых видов рода *Achillea* L.

На гистограмме видно, что среднее число цветков в элементарном соцветии корзинка у сравниваемых видов отличается. При этом наименьшее значение среднего числа отмечено у фармакопейного вида – тысячелистника обыкновенного. Выявлена значительная разница между показателями средних величин встречаемости цветков тысячелистника обыкновенного от тысячелистника хрящеватого на 5 и тысячелистника благородного на 3, что позволяет использовать данный признак в качестве одного из диагностически значимых.

Особенности обёрток соцветий корзинка у травы тысячелистника обыкновенного в незначительной степени описаны в частных фармакопейных статьях. Так, в ГФ РФ XIV издания отмечена их продолговато-яйцевидная форма, а также перепончатый край с бурой пигментацией [11]. Однако, проанализировав данные общей ботаники и, в частности, ключи определения видов рода *Achillea* L., выявлено, что степень пигментации обёрток соцветий и их размеры (длина и ширина) является селективным признаком, отличающим ряд видов [34, 41, 57, 61, 63]. Данный факт потребовал экспериментального уточнения.

Отобранные ранее элементарные соцветия корзинка с достоверно известных особей трёх видов рода *Achillea* L. подвергались препарированию. Совокупность обёрток каждого соцветия оценивалась по показателям длины, ширины и пигментации края (рис. 9).

По результатам анализа было обнаружено, что количество обёрток на одном соцветии у всех сравниваемых видов варьируется в диапазоне от 13 до 15 штук. В среднем число обёрток у сравниваемых видов приблизительно равно и не является диагностической особенностью.

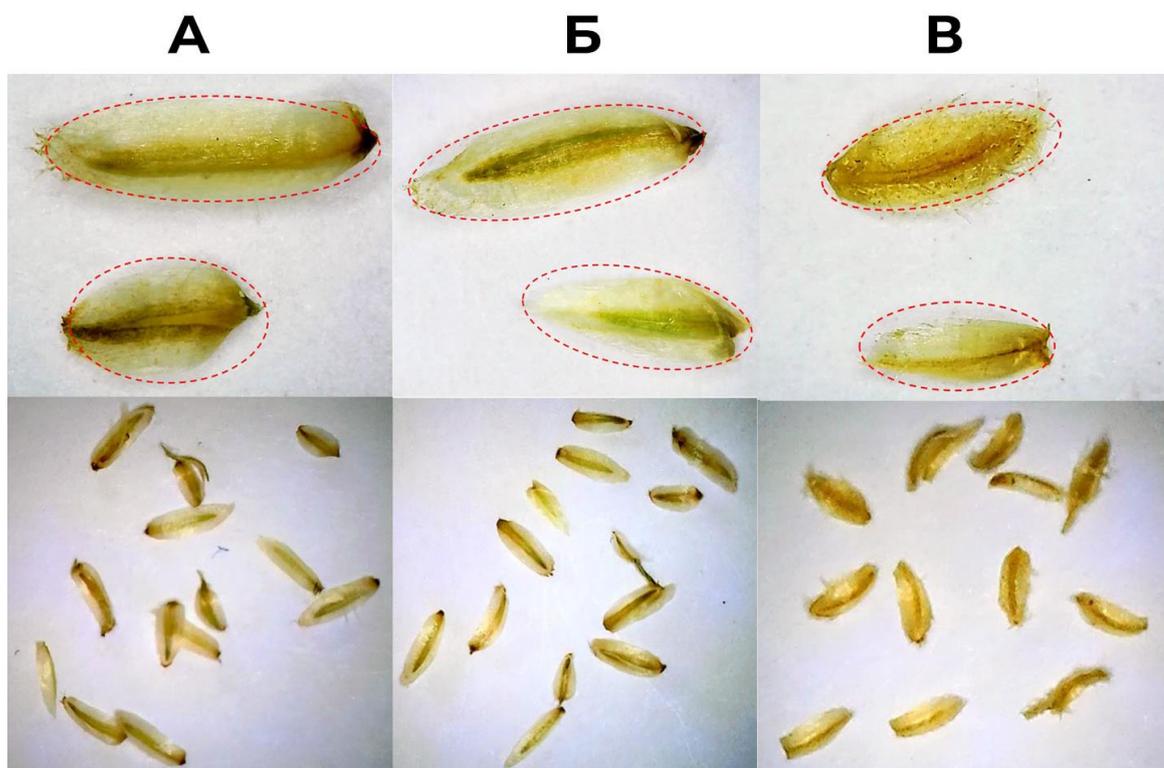


Рисунок 9 – Статистическая обработка признака «Длина и ширина листочков обёртки» (вверху – $\times 40$, снизу – $\times 20$)

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

При сравнении размерных характеристик обёрток выявлено, что у каждого элементарного соцветия имеется две группы обёрток резко отличимых по длине. В эксперименте нами были выделены «малые» и «крупные» обертки. Их размерные характеристики (длина и ширина), а также соотношение длины к ширине представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Общая таблица сравнения форм, ширины и длины листочков обёртки и их соотношение некоторых видов рода *Achilléa* L.

Вид	Крупные листочки обёртки			Малые листочки обёртки		
	Длина, мм	Ширина, мм	Соотношение	Длина, мм	Ширина, мм	Соотношение
Тысячелистник обыкновенный	5,5±0,1	2,1±0,12	1:3	3,4±0,2	2,1±0,14	1:2
Тысячелистник хрящеватый	4,2±0,1	2,1±0,12	1:2	2,9±0,17	1,6±0,18	1:3
Тысячелистник благородный	3,5±0,1	1,5±0,09	1:2	2,5±0,19	1,1±0,16	1:3

Из таблицы 9 видно, что значение ширины листочков у сравниваемых видов практически сходно. Наибольшее отличие по размерам нами отмечено в показателях длины. Наибольшая длина листочков обёрток отмечается у тысячелистника обыкновенного (варьирует от 5,2±0,1 мм до 5,8±0,1 мм), что значительно больше, чем у тысячелистника хрящеватого (варьирует от 3,80±0,1 мм до 4,40±0,1 мм) и тысячелистника благородного (варьирует от 3,20±0,1 мм до 3,80±0,1 мм).

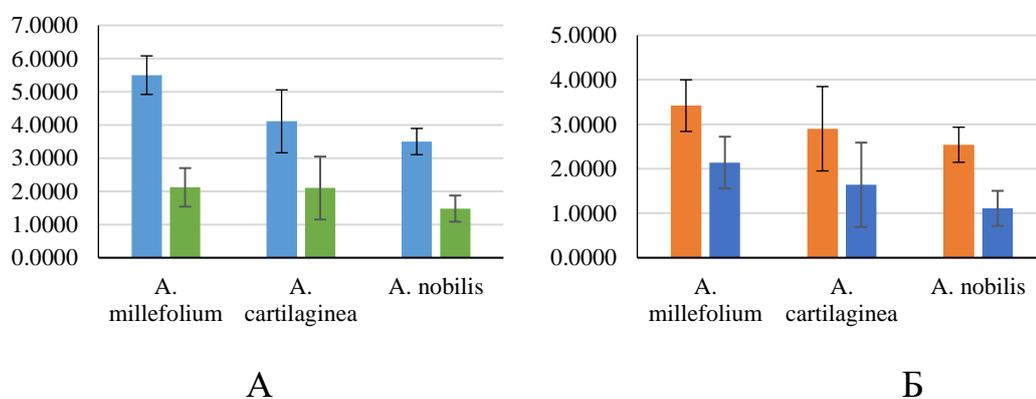


Рисунок 10 – Гистограмма сравнения признака «Длина (А) и ширина (Б) листочков обёртки» некоторых видов рода *Achilléa* L.

На гистограммах сравнения средних показателей длины и ширины обёрток элементарных соцветий корзинка у трёх сравниваемых видов (рис. 10) очевидно, что длина обёрток может являться дополнительным признаком, косвенно указывающим на тысячелистник обыкновенный. Показатель длины, напротив, не селективен и только в случае тысячелистника благородного может косвенно свидетельствовать о его подмеси к фармакопейному сырью.

Пигментация обёртки соцветий видов рода *Achilléa* L. как характеристика описана во многих определителях средней полосы РФ и бывшего СССР [34, 41, 57, 61, 63], однако зачастую степень пигментации не уточняется. Имеются также и взаимоисключающие определения – например, во Флоре СССР том XXVI стр. 76 при характеристике вида тысячелистник благородный листочки обёртки описаны следующим образом: «... бледно окрашены, килеватые, продолговатые, с узкой белой или реже бурой плёнчатой каймой» [63].

В эксперименте нами установлено, что бурая пигментация обёрток по краю присутствует у всех сравниваемых видов (рис. 11). Отличие кроется в степени пигментации по контуру обёртки.



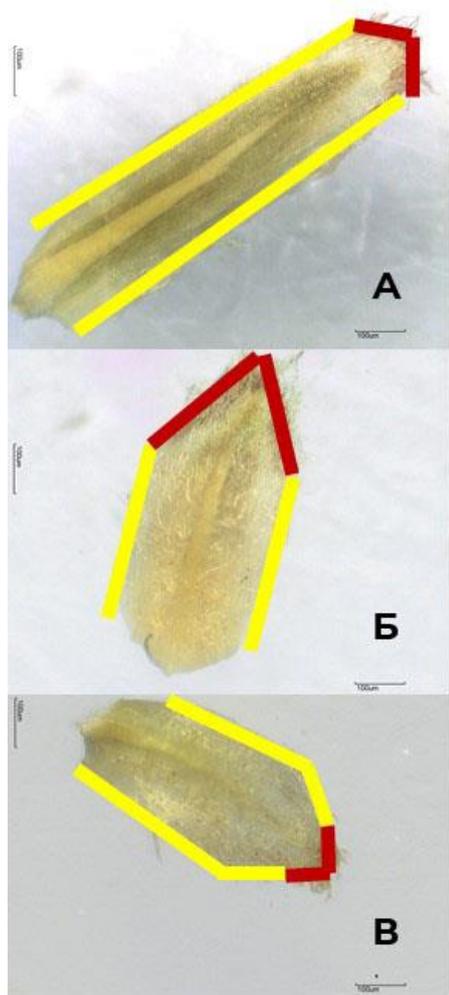
Рисунок 11 – Сравнение признака «Пигментация края обёртки»

Обозначения: 1 – Тысячелистник обыкновенный: А – листочки обёртки на элементарном соцветии корзинка; Б – листочек обёртки.

2 – Тысячелистник хрящеватый: А – листочки обёртки на элементарном соцветии корзинка; Б – листочек обёртки.

3 – Тысячелистник благородный: А – листочки обёртки на элементарном соцветии корзинка; Б – листочек обёртки.

Для более устойчивого дифференциально признака нами оценивалась степень пигментации в % от общей длины контура обёртки за исключением мета её прикрепления (основания). Определение степени пигментации проводили на выборке не менее 10 экземпляров обёрток (рис. 12). Процент пигментации в зависимости от вида тысячелистника указан на гистограмме (рис. 13).



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 12 – Статистическая обработка признака «Пигментация края листочков обёртки»

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

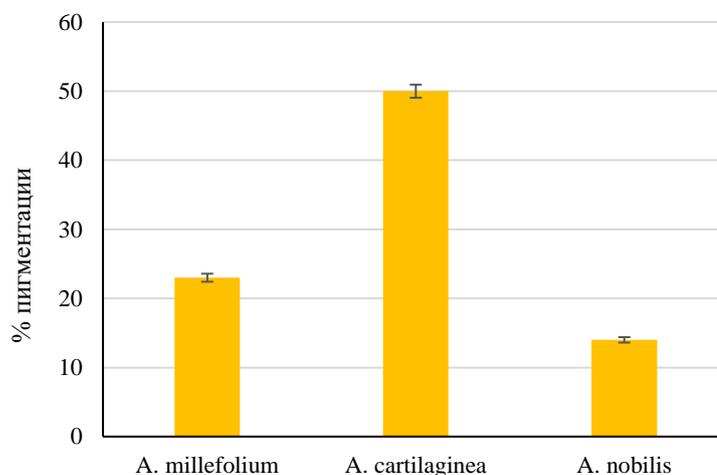


Рисунок 13 – Гистограмма сравнения признака «Пигментация края листочков обёртки» некоторых видов рода *Achillea* L.

Из гистограммы видно, что наибольшая пигментация контура обёртки (до 50%) характерна для растений вида тысячелистник хрящеватый, что соответствует описанию в фундаментальных источниках литературы [34, 41, 57, 61, 63]. У растений вида тысячелистник обыкновенный пигментация присутствует только на вершине овально-яйцевидной обёртки и насчитывает до 24% от общей протяженности контура обёртки. Наименьшая степень пигментации характерна для тысячелистника благородного – до 14%, что также подтверждает классическое описание в фундаментальных источниках [34, 41, 57, 61, 63].

Необходимо отметить, что процентное выражение степени пигментации края обёртки более селективно и может являться дополнительным косвенным признаком видовой специфичности, а также присутствия примесных видов в сырье.

Отдельно необходимо выделить особенность строения листовой пластинки, характерную для большинства видов рода *Achillea* L., заключающуюся в наличии хрящевидных остроконечий на долях перистоизрезанного листа (тысячелистник обыкновенный, тысячелистник благородный) или на дважды пальчатом крае цельной листовой пластинки (тысячелистник хрящеватый). Указанная особенность используется в классических определителях как один из отличительных признаков некоторых видов тысячелистников [34, 41, 57, 61, 63]. Однако в отечественной фармакопее данный признак не представлен [11]. Необходимо отметить, что в ряде зарубежных фармакопей, в частности, Американской травяной фармакопее, хрящевидное остроконечие – шипик – описан как в морфологии, так и гистологическом анализе [12, 13, 16, 74].

В эксперименте нами проанализировано диагностическое значение хрящевидного остроконечия или шипика для выбранных видов.

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 выявило лигнификацию клеток шипика (рис. 14).

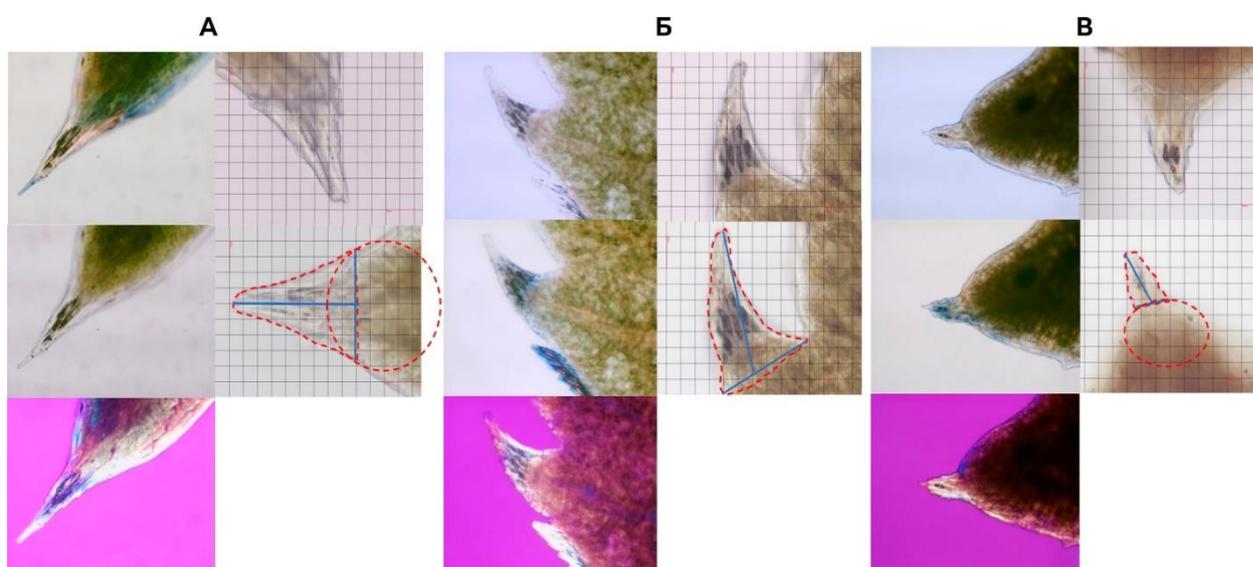


Рисунок 14 – Статистическая обработка признака «Длина и ширина шипика листа»

Сравнительные данные очертания и размеров шипиков сравниваемых видов представлены в таблице 10, а также на гистограмме сравнения размеров шипиков (рис. 15).

На гистограмме сравнения длины и ширины шипиков очевидно, что в основной массе шипики у тысячелистника обыкновенного крупнее прочих видов как по длине, так и по ширине. Наименьший размер шипика в группе видов сравнения имеет тысячелистник благородный.

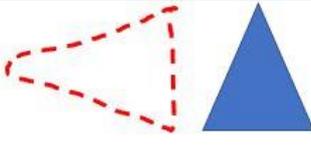
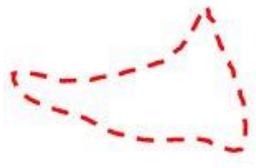
Несмотря на отличие в размерах шипиков, на наш взгляд, наибольшую диагностичность имеет форма шипика, нежели его размер, так как он в значительной степени привязан к экологическим условиям обитания.

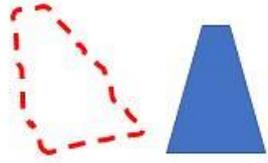
Шипик тысячелистника обыкновенного треугольной или клиновидной формы, является прямым продолжением доли перистого листа, как правило, без видимых отступов.

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 допустим и диагностируется по особой когтевидной форме шипика, расположенного на дважды пальчатом крае листовой пластинки. Гистологически схож с шипиками сравниваемых видов, но имеет загнутую, напоминающую коготь форму.

Таблица 10 – Общая таблица сравнения форм, ширины и длины шипиков листьев

Вид	Длина от центра основания до вершины шипика, мкм	Ширина в основании шипика, мкм	Форма – схема	Описание формы
Тысячелистник обыкновенный	66,1±0,1	52,8±0,19		Клиновидная
Тысячелистник хрящеватый	40,8±0,13	30,6±0,12		Когтевидная

Тысячелистник благородный	19,4±0,13	15,8±0,16		Остротрапе- циевидная
------------------------------	-----------	-----------	--	--------------------------

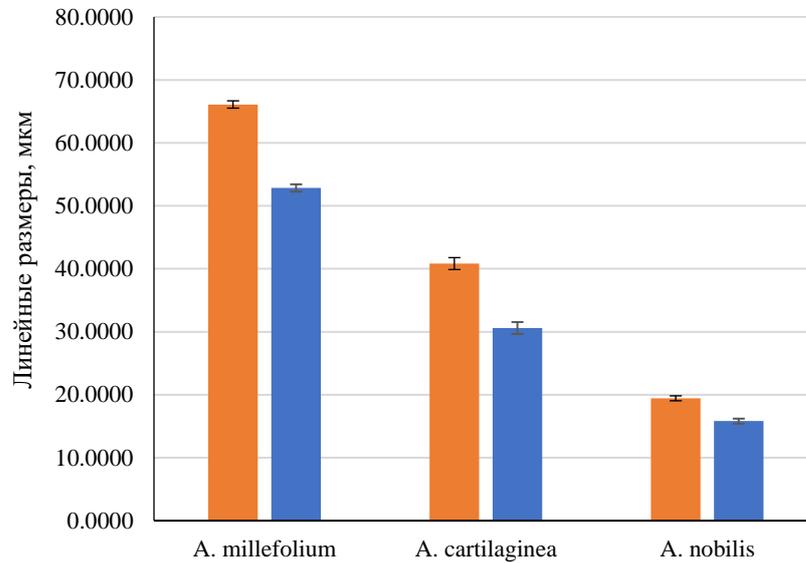


Рисунок 15 – Гистограмма сравнения признака «Длина и ширина шишиков листьев»

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 [43], выделены основные особенности пыльцевых зерен видов рода *Achillea* L. (таблица 11).

Таблица 11 – Сравнительная характеристика пыльцевых зёрен видов рода *Achillea* L. [43]

Вид	Тип пыльцевого зерна	Очертания пыльцевого зерна	Полярная ось, мм	Экваториальный диаметр, мм	P/E	Борозды и оры	Контур пыльцевого зерна	Скульптура поверхности пыльцевого зерна	Шипы	Экзина
Тысячелистник обыкновенный	3-бороздно-оровые, сфероидальные или эллипсоидальные	в полярном положении округло-3-лопастные, в экваториальном — эллиптические	30,9 (28,0 — 34,4)	26,8 (25,3—28,0)	1,15	Борозды почти щелевидные, длиной от 21,0 до 25,0 мкм. Оры округлые, диаметром 4,7—6,0 мкм, не всегда хорошо различимы	крупнозубчатый	шиповатая, между основаниями шипов волнистая, пронизана перфорациями, так же, как и нижняя половина шипов	невысокие, 2,6-3,0 мкм, реже 5,0 мкм, диаметр основания около 3,0 мкм. Расстояние между вершинами шипов около 7,7 мкм. Мембрана борозд мелкогранулярная. Мембрана ор гладкая.	2,0 – 3,0 мкм
Тысячелистник хрящеватый	3-бороздно-оровые, сфероидальные или эллипсоидальные	в полярном положении 33-лопастные, в экваториальном —	22,9 (20,2 — 28,4)	23,9 (21,5—27,5) мкм	0,96	Борозды длинные, около 15,6 мкм. Оры слабо заметны, вытянуты вдоль борозды,	крупнозубчатый	шиповатая	Шипы крупные, конусовидные, с широкими основаниями, пронизанными перфорациями.	Двуслойная, толщиной 2,5-3,5 мкм, иногда в области мезокольпи

		эллиптические или округлые				длиной около 5,6 мкм.			Высота шипов около 3,4 мкм. Между основаниями шипов — небольшие промежутки со слабоволнистой, почти гладкой поверхностью. Шипы расположены редко. Мембрана борозд и ор гладкая.	ума экзина утолщается.
Тысячелистник благородный	3-бороздно-оровые, сфероидальные или сплюсненно-сфероидальные	в полярном положении 3-лопастные с четко выраженными лопастями, в экваториальном — эллиптические или округлые	17,5 (16,3-20,1)	19,7 (18,6—20,6)	0,89	Борозды погруженные, длиной около 13,2 мкм. Ора слабо заметна.	крупнозубчатый	шиповатая	не очень высокие, в среднем 2,99 мкм. Основания шипов широкие, диаметром около 3,0 мкм, окружены крупными перфорациями. Расстояние между вершинами шипов 6,5 мкм. Мембрана борозд и ор гладкая.	толщиной 3,66 (3,01-4,7) мкм, на мезокольпите часто утолщена

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 16.

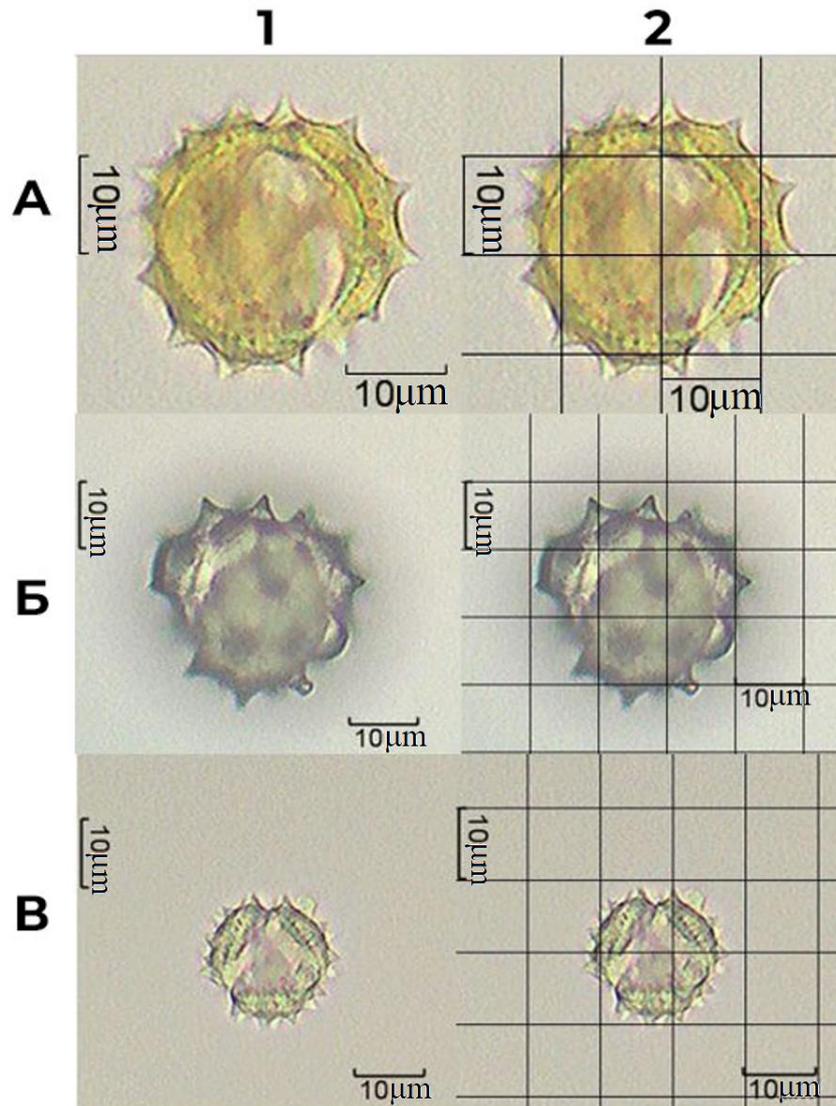


Рисунок 16 – Статистическая обработка признака «Количество шипов на поверхности пыльцы»: *А – тысячелистник обыкновенный; Б – тысячелистник хрящеватый; В – тысячелистник благородный*

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

Таблица 12 – Метрологические характеристики признака «Количество шипов на поверхности пыльцы» в траве тысячелистника обыкновенного

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>n</i>	20	18	22	25	20	23	21	22	18	20
<i>Образец</i>	<i>f</i>	<i>X_{ср}</i>	<i>S</i>	<i>P, %</i>	<i>t (P,f)</i>		ΔX		<i>E, %</i>	
Количество шипов на поверхности пыльцы	10	20,90	2,18	95	2,23		±1,5603		±7,47	

Таблица 13 – Метрологические характеристики признака «Количество шипов на поверхности пыльцы» в траве тысячелистника хрящеватого

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>n</i>	15	18	20	13	17	15	20	22	14	15
<i>Образец</i>	<i>f</i>	<i>X_{ср}</i>	<i>S</i>	<i>P, %</i>	<i>t (P,f)</i>		ΔX		<i>E, %</i>	
Количество шипов на поверхности пыльцы	10	16,90	3,00	95	2,23		±2,9981		±12,68	

Таблица 14 – Метрологические характеристики признака «Количество шипов на поверхности пыльцы» в траве тысячелистника благородного

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>n</i>	21	19	17	23	20	15	21	17	19	21
<i>Образец</i>	<i>f</i>	<i>X_{ср}</i>	<i>S</i>	<i>P, %</i>	<i>t (P,f)</i>		ΔX		<i>E, %</i>	
Количество шипов на поверхности пыльцы	10	19,30	2,41	95	2,23		±1,7195		±8,91	

На гистограммах сравнения видно, что размер пыльцевого зерна в группе сравнения является слабо диагностичным ввиду сходства диаметров пыльцевых зерен у тысячелистника обыкновенного и тысячелистника хрящеватого. Размерность диаметров пыльцевых зерен позволяет косвенно определить наличие примесного вида тысячелистника благородного в сырье, так как размер его пыльцевых зерен в среднем не превышает 18 мкм относительно 25 мкм тысячелистника обыкновенного (рис. 17).

На наш взгляд, число шипов на поверхности пыльцевых зёрен можно считать более селективным признаком. Так, у тысячелистника обыкновенного, в среднем, показатель числа шипов достигает 25, что значительно больше, чем у примесных видов (рис. 17).

Следует отметить, что структурная характеристика зерна пыльцы может быть использована в фарманализе как один из признаков сырья. Необходимо отметить, что ранее в частной ФС на траву тысячелистника обыкновенного в ГФ РФ пыльцевые зерна не описывались [11].

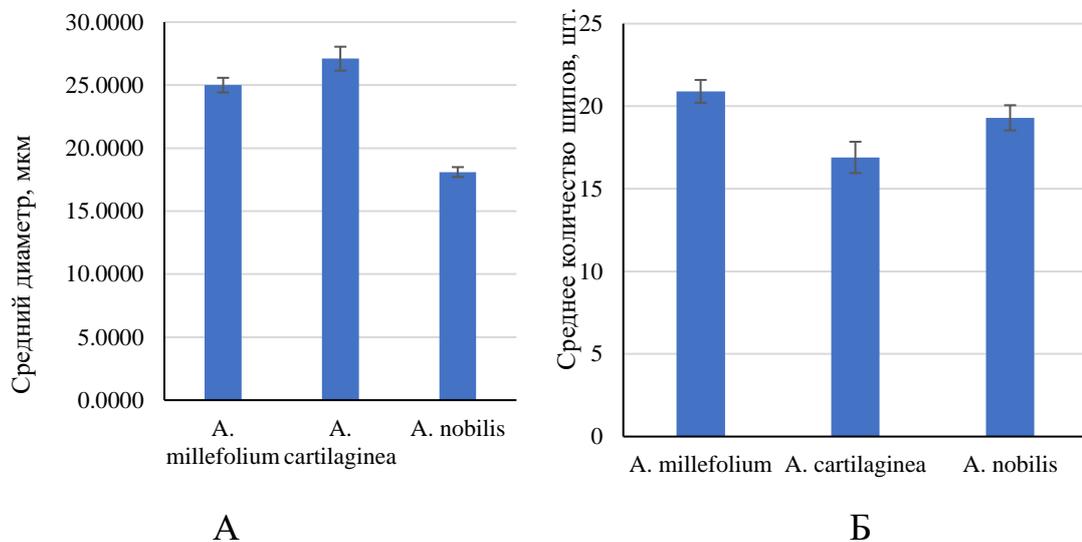


Рисунок 17 – Гистограмма сравнения признака «Морфология пыльцы и количество шипов на поверхности пыльцы»

С целью валидации методики и подтверждения признаков, выявленных ранее, нами была смоделировано цельное и измельченное сырьё травы тысячелистника обыкновенного. Модельная смесь подготовлена в соответствии с требованиями частной ФС на *Achillea millefolium*, а также «Инструкции по сбору и сушке травы и цветков тысячелистника обыкновенного» [11, 54]. В соответствии с требованиями подготовлены облиственные верхушки побегов длиной до 15 см; степень измельчения для измельченного сырья – до 7 мм (рис. 18).

При изучении внешних признаков подтверждено наличие признаков, описанных в фундаментальной ботанике, а также в нормативной документации: наличие элементарных соцветий корзинка, собранных в щиток, форма и степень

изрезанности листьев, наличие/отсутствие желёзок на поверхности листьев, степень опушенности листьев.



Рисунок 18 – Модельная смесь травы тысячелистника обыкновенного

Детальное изучение элементарных соцветий корзинка в выборке в количестве 10 штук подтвердило, что количество цветков в соцветии варьирует от 10 до 15 (рис. 19, табл. 15).

Также подтверждены размеры и степень пигментации листочков обёртки: 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 – $23 \pm 0,1\%$.



Рисунок 19 – Статистическая обработка цветков в элементарном соцветии корзинка и листочков обёртки в модельном сырье

Обозначения: *А* – соцветие тысячелистника обыкновенного; *Б* – выборка цветков в элементарном соцветии корзинка и листочков обёртки в модельном сырье.

Таблица 15 – Метрологические характеристики признака «Количество цветков в элементарном соцветии корзинка» в модельном сырье

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>n</i>	15	12	14	15	11	13	15	13	12	15
<i>Образец</i>	<i>f</i>	<i>X_{ср}</i>	<i>S</i>	<i>P, %</i>	<i>t (P,f)</i>		ΔX		<i>E, %</i>	
Количество цветков в элементарном соцветии корзинка	10	13,50	1,51	95	2,23		±1,0786		±7,99	

Изучение шипика на листе показало, что он имеет схожую форму и размеры – 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 (рис. 20).

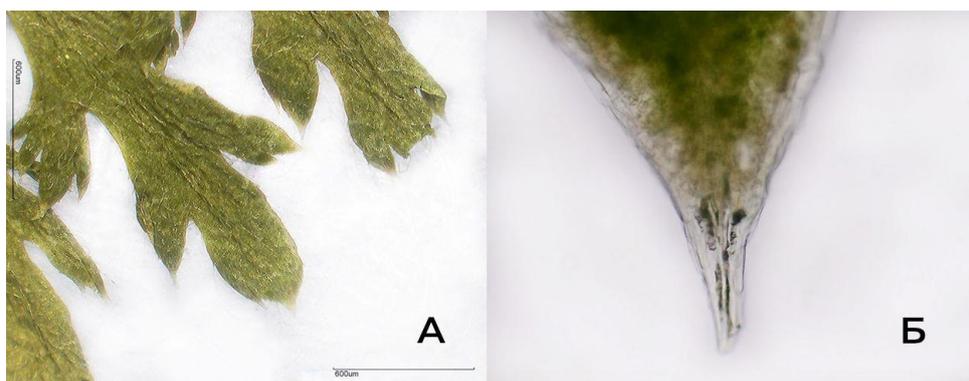


Рисунок 20 – Статистическая обработка шипиков листьев модельного сырья
 Обозначения: *A* – микропрепарат шипика листа; *B* – шипик листа в поляризационном микроскопе.

В результате анализа пыльцы выявлено, что пыльцевые зерна из модельной смеси имеют схожую форму и размеры – средний диаметр составил $25,40 \pm 2,29$ мкм, среднее число шипов на поверхности пыльцы – $21 \pm 1,7$ (рис. 21, табл. 16).

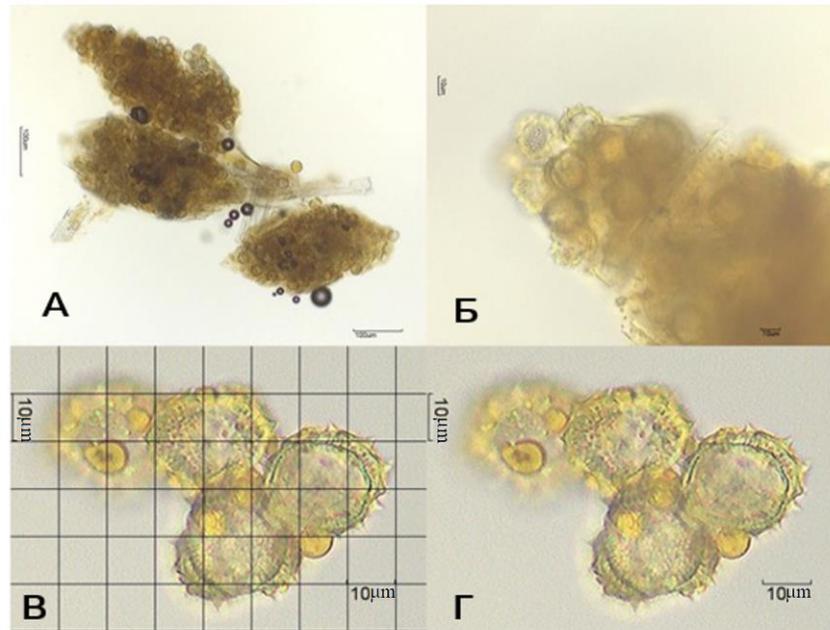


Рисунок 21 – Статистическая обработка пыльцевых зёрен модельного сыря
 Обозначения: А – пыльник цветка ($\times 40$); Б – пыльник цветка ($\times 100$);
 В – размерность пыльцевых зёрен ($\times 400$); Г – пыльцевые зёрна ($\times 400$).

Таблица 16 – Метрологические характеристики признака «Количество шипов на поверхности пыльцы» в модельном сыре

№	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>n</i>	20	22	25	18	19	20	21	20	22	25
Образец	<i>f</i>	<i>X_{ср}</i>	<i>S</i>	<i>P, %</i>	<i>t (P,f)</i>		ΔX		<i>E, %</i>	
Количество шипов на поверхности пыльцы	10	21,20	2,35	95	2,23		$\pm 1,6778$		$\pm 7,91$	

Таким образом, изучение модельной смеси позволило подтвердить, что описанные ранее признаки могут являться селективными для травы тысячелистника обыкновенного.

С целью подтверждения данной гипотезы нами был проанализирован образец промышленного сыря в фасовке измельченного сыря (трава измельченная пакет бумажный 50 г) и порошка (фильтр-пакет 20 шт).

Внешний осмотр подтвердил наличие всех элементов, указанных в ФС.2.5.0101.18 для измельченного сыря – кусочки листьев, стеблей, цветочных

корзинок и отдельные цветки, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм.

Далее измельченное сырье подвергли ситовому анализу, которое было поделено на фракции >3 мм, >2 мм, >1 мм и $>0,5$ мм. Выбор данных фракций объясняется тем, что они являются наиболее уязвимыми с точки зрения проведения анатомо-морфологического и гистологического анализа сырья.

Анализ фракции >3 мм фасованного сырья выявил наличие всех элементов измельченного сырья, описанных ранее (рис. 22). Также проведен анализ по предложенным признакам:

- «Количество цветков в элементарном соцветии корзинка» – в выборке в количестве 5 шт установлено, что количество цветков варьирует от 10 до 15 шт в одном элементарном соцветии;
- «Размеры листочка обертки и степень его пигментации» – в выборке в количестве 10 шт установлено, что степень пигментации составила 25%;
- «Длина и ширина шипиков листьев» – при анализе кусочков листьев выявлен концевой шипик клиновидной формы; длина от центра основания до вершины шипика составила $63,4 \pm 0,1$ мкм, ширина в основании шипика составила $54,9 \pm 0,2$ мкм;
- «Диаметр пыльцевого зерна и количество шипов на поверхности» – при анализе пыльцы выявлено, что диаметр пыльцевого зерна – от 20 до 25 мкм, количество шипов на поверхности – от 20 до 25 шт.



Рисунок 22 – Анализ фракции >3 мм фасованного сырья

Анализ фракции >2 мм фасованного сырья также выявил наличие всех элементов измельченного сырья, описанных ранее (рис. 23). Также проведен анализ по предложенным признакам:

- «Количество цветков в элементарном соцветии корзинка» – в выборке в количестве 10 шт установлено, что количество цветков варьирует от 12 до 15 шт в одном элементарном соцветии;
- «Размеры листочка обёртки и степень его пигментации» – в выборке в количестве 10 шт установлено, что степень пигментации составила 22%;
- «Длина и ширина шипиков листьев» – при анализе кусочков листьев выявлен концевой шипик клиновидной формы; длина от центра основания до вершины шипика составила $63,2 \pm 0,1$ мкм, ширина в основании шипика составила $54,8 \pm 0,2$ мкм;
- «Диаметр пыльцевого зерна и количество шипов на поверхности» – при анализе пыльцы выявлено, что диаметр пыльцевого зерна – от 20 до 25 мкм, количество шипов на поверхности – от 20 до 25 шт.



Рисунок 23 – Анализ фракции >2 мм фасованного сырья

Фракции >1 мм и >0,5 мм (порошок) не описаны в частной ФС на *Achillea millefolium*, однако морфолого-анатомический и гистохимический анализы описаны в Европейской, Британской, Американской травяной фармакопеях. Кроме того, они описаны в Государственной фармакопее Республики Казахстан и Государственной фармакопее Украины [13, 16, 74, 81, 86]. Необходимость анализа порошка травы тысячелистника объясняется возможностью попадания потенциальных примесей близкородственных видов.

Анализ фракции >1 мм фасованного сырья по предложенным признакам выявил следующие особенности (рис. 24):

- «Количество цветков в элементарном соцветии корзинка» – в выборке в количестве 5 шт установлено, что количество цветков варьирует от 10 до 14 шт в одном элементарном соцветии;
- «Размеры листочка обёртки и степень его пигментации» – в выборке в количестве 10 шт установлено, что степень пигментации составила 21%;
- «Длина и ширина шипиков листьев» – при анализе кусочков листьев выявлен концевой шипик клиновидной формы; длина от центра основания до вершины шипика составила $63,2 \pm 0,1$ мкм, ширина в основании шипика составила $54,7 \pm 0,2$ мкм;

- «Диаметр пыльцевого зерна и количество шипов на поверхности» – при анализе пыльцы выявлено, что диаметр пыльцевого зерна – от 20 до 25 мкм, количество шипов на поверхности – от 20 до 25 шт.



Рисунок 24 – Анализ фракции >1 мм фасованного сырья

Анализ фракции >0,5 мм не выявил наличие элементарных соцветий корзинка, однако возможно обнаружить отдельные структурные элементы – фрагменты листьев, стеблей, отдельные цветки (рис. 25). Анализ по предложенным признакам выявил следующие особенности:

- «Длина и ширина шипиков листьев» – при анализе кусочков листьев выявлен концевой шипик клиновидной формы; длина от центра основания до вершины шипика составила $62,9 \pm 0,1$ мкм, ширина в основании шипика составила $54,6 \pm 0,2$ мкм;
- «Диаметр пыльцевого зерна и количество шипов на поверхности» – при анализе пыльцы выявлено, что диаметр пыльцевого зерна – от 20 до 25 мкм, количество шипов на поверхности – от 18 до 25 шт.



Рисунок 25 – Анализ фракции $>0,5$ мм фасованного сырья

Структура фракции порошка из фильтров-пакетов совпадает с фракцией $>0,5$ мм измельченного сырья, поэтому при анализе использовались аналогичные признаки (рис. 26). Анализ выявил схожие признаки, а именно:

- «Длина и ширина шпиков листьев» – при анализе кусочков листьев выявлен концевой шпик клиновидной формы; длина от центра основания до вершины шпика составила $62,9 \pm 0,1$ мкм, ширина в основании шпика составила $54,6 \pm 0,2$ мкм;
- «Диаметр пыльцевого зерна и количество шипов на поверхности» – при анализе пыльцы выявлено, что диаметр пыльцевого зерна – от 20 до 25 мкм, количество шипов на поверхности – от 18 до 25 шт.



Рисунок 26 – Анализ фракции порошка из фильтр-пакетов

Таким образом, путем проведения морфолого-анатомического анализа были выявлены следующие характеристики, которые имеют селективное и диагностическое значение:

- 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 *Achillea millefolium* предложены следующие параметры:

- «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 $20,0 \pm 0,1\%$, при этом не более $49,0 \pm 0,1\%$.
- «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» – $D_{\text{ср}}$ 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 измельчённого сырья, а также для порошка, анализ которого не описывался ранее в отечественной нормативной документации на траву тысячелистника обыкновенного.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 3

1. Проведено сравнительное анатомо-морфологическое исследование тысячелисника обыкновенного, тысячелистника хрящватого и тысячелисника благородного с использованием методов световой микроскопии и поляризационной микроскопии.

2. Сравнительный морфолого-анатомический анализ позволил выявить следующие селективные и диагностически значимые признаки:

- 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 экзины.

3. Для *Achillea millefolium* предложены следующие параметры:

- «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 $2,30 \pm 0,15$ 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 $20,0 \pm 0,1\%$, 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 – $21 \pm 1,7$.

ГЛАВА 4. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВЕЩЕСТВ ИЗ ТРАВЫ ТЫСЯЧЕЛИСТНИКА ОБЫКНОВЕННОГО

С целью изучения компонентного состава травы *Achillea millefolium* L. нами было проведено извлечение индивидуальных соединений методом адсорбционной колоночной хроматографии.

4.1. Извлечение индивидуальных соединений из травы *A. millefolium* L.

С целью проведения данного исследования, получали экстракт из 150 г травы тысячелистника обыкновенного методом дробной модифицированной мацерации, используя 70% этанол в соотношении 1:5. Далее это экстракт был упарен на бане водной, нанесен на силикагель КСК 50/100, высушен.

В эксперименте в качестве элюэнтов задействован хлороформ, а также смеси хлороформа и этанола в различных соотношениях. Полученные растворители были разделены на фракции $V=200$ мл и далее упарены на установке ротационно-вакуумной до $V=10$ мл (табл. 17).

Таблица 17 – Схема элюирования фракций из экстракта травы *A. millefolium* L.

№ фракций экстракта травы	Состав элюента, %		Объем элюента для экстракта травы, мл
	Хлороформ	Этанол 96%	
–	100	0	–
1-7	99	1	1000
8-13	97	3	1000
14-20	95	5	1000
21-26	93	7	1000
27-33	90	10	1000
34-36	85	15	500
37-44	80	20	1000
45-51	70	30	1000
52-59	60	40	1000

60-67	50	50	1000
68-71	60	40	1000
72-77	0	100	—

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

4.2. Идентификация выделенных веществ из травы *Achillea millefolium*.

Вещество **1** с $R_f \approx 0,6$ из травы тысячелистника обыкновенного извлекли из фракций, полученных элюированием смесью хлороформа и этилового спирта (80:20).

Соединение **2** с $R_f \approx 0,8$ получено из фракции №18 той же колонки. Соединение **2** получено также в результате кислотного и ферментативного гидролиза вещества **1**.

Также выявлено вещество **3** с величиной $R_f \approx 0,7$ во фракциях №52-56.

В основе определения извлеченных соединений использованы данные УФ-, ^1H -ЯМР-, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии (Приложение 2).

Кислотный гидролиз образцов **1** и **2** проведен в присутствии р-ра 2% HCl на бане кипящей водной в течение 2 ч. Ферментативный гидролиз гликозидов **1** и **2** осуществляли в водном растворе β -глюкозидазы («Sigma»).

Идентификацию глюкозы в кислотном гидролизате осуществляли хроматографией на бумаге в системе элюэтов: *n*-бутанол-уксусная кислота ледяная -вода с соотношением 4:1:2 (анилинофтальатный реактив).

Спектральные характеристики веществ указаны в таблице 18.

Таблица 18 – Физико-химические характеристики выделенных соединений

№ п/п	Название и химическая формула соединения	Характеристики вещества
1.	Космосинн (7-О-β-О- глюкопиранозид апигенина) (1).	<p>Кристаллы светло-желтого цвета, $C_{21}H_{20}O_{10}$, т.пл. 225-227°C (водный спирт). λ_{max} EtOH 270, 334 нм; +NaOAc, 269, 378; +NaOMe, 278, 397; +AlCl₃, 279, 330, 347, 384; +AlCl₃+HCl 279, 330, 347, 384.</p> <p>Спектр ЯМР ¹H (399.78 МГц, DMSO-d₆, 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. 340-342 °C (водный спирт). λ_{max} EtOH 270 нм,</p>

		<p>335; +NaOAc, 276, 377; + NaOAc +H₃BO₃ 270, 380 нм; +AlCl₃, 279, 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-</p>
--	--	--

		<p>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 пл, 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),</p>

		<p>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-D-глюкопиранозид апигенина)**; соединения **2** и **3** определены 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.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 4

1. Из травы тысячелистника обыкновенного извлечены 4 индивидуальных соединения, которые были отнесены к флавоноидам. Структурный состав был определен с помощью УФ-, ^1H -ЯМР- и ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, различных химических превращений (кислотный и ферментативный гидролиз).

2. Соединение **1** идентифицировано как **космосин (7-О- β -О-глюкопиранозид апигенина)**; соединения **2** и **3** установлены как **апигенин (5,7,4'-тригидроксифлавоноид)** и **цинарозид (7-О- β -D-глюкопиранозид лютеолина)**. Следует отметить, что **апигенин (5,7,4'-тригидроксифлавоноид)** впервые выделен из сырья данного растения. По итогам проведения кислотного и ферментативного гидролиза цинарозида (**3**) извлечен агликон, который был определен как **лютеолин (5,7,3',4'-тетрагидроксифлавоноид)**, не обнаруженный в свободном виде в *Achillea millefolium*.

3. Флавоноиды **1-4**, описанные выше, впервые были обнаружены в экстракте из травы *Achillea millefolium*, который был заготовлен на территории Самарской области.

ГЛАВА 5. СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПОДХОДОВ К СТАНДАРТИЗАЦИИ ТРАВЫ ТЫСЯЧЕЛИСТНИКА

5.1. Определение подлинности видов рода *Achillea* L. методом ТСХ

С целью совершенствования методики определения биологически активных веществ травы тысячелистника обыкновенного методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) выполнены анализы методом хроматографии, в результате которых были обнаружены определенные характеристики хроматографических профилей анализируемых образцов. В качестве стандартных образцов использовались не только соединения, извлеченные из травы тысячелистника обыкновенного, а также рутин, кверцетин, кемпферол, хлорогеновая кислота, кофейная кислота; ранее была упомянута информация о наличии данных соединений в объектах исследования.

Поскольку доминирующими и диагностически значимыми БАС в траве тысячелистника являются флавоноиды, нами были применены следующие методы для их детекции: обработка 3% раствором спиртовым алюминия хлорида, визуальный осмотр в УФ-свете при $\lambda=254$ и $\lambda=365$ нм до и после добавления реактива, а также обработка раствором диазобензолсульфокислоты в щелочной среде (рис. 27).

В результате эксперимента выделены три адсорбционные зоны, которые имеют желтое окрашивание при рассмотрении в видимом свете, ярко-желтое флуоресцентное свечение при рассмотрении в УФ-свете с $\lambda=365$ нм (при добавлении реагента $AlCl_3$) и оранжево-желтое окрашивание после дальнейшей обработки щелочным раствором ДСК.

Одна из зон адсорбции размещена на уровне зоны раствора СО цинарозида с величиной $R_f \approx 0,7$, в связи с этим можно отнести его к цинарозиду. Вторая доминирующая зона абсорбции с величиной R_s 1,3 относительно СО цинарозида определена нами как космосин. Зона адсорбции желтого цвета с $R_f \approx 0,8$ определена как апигенин.

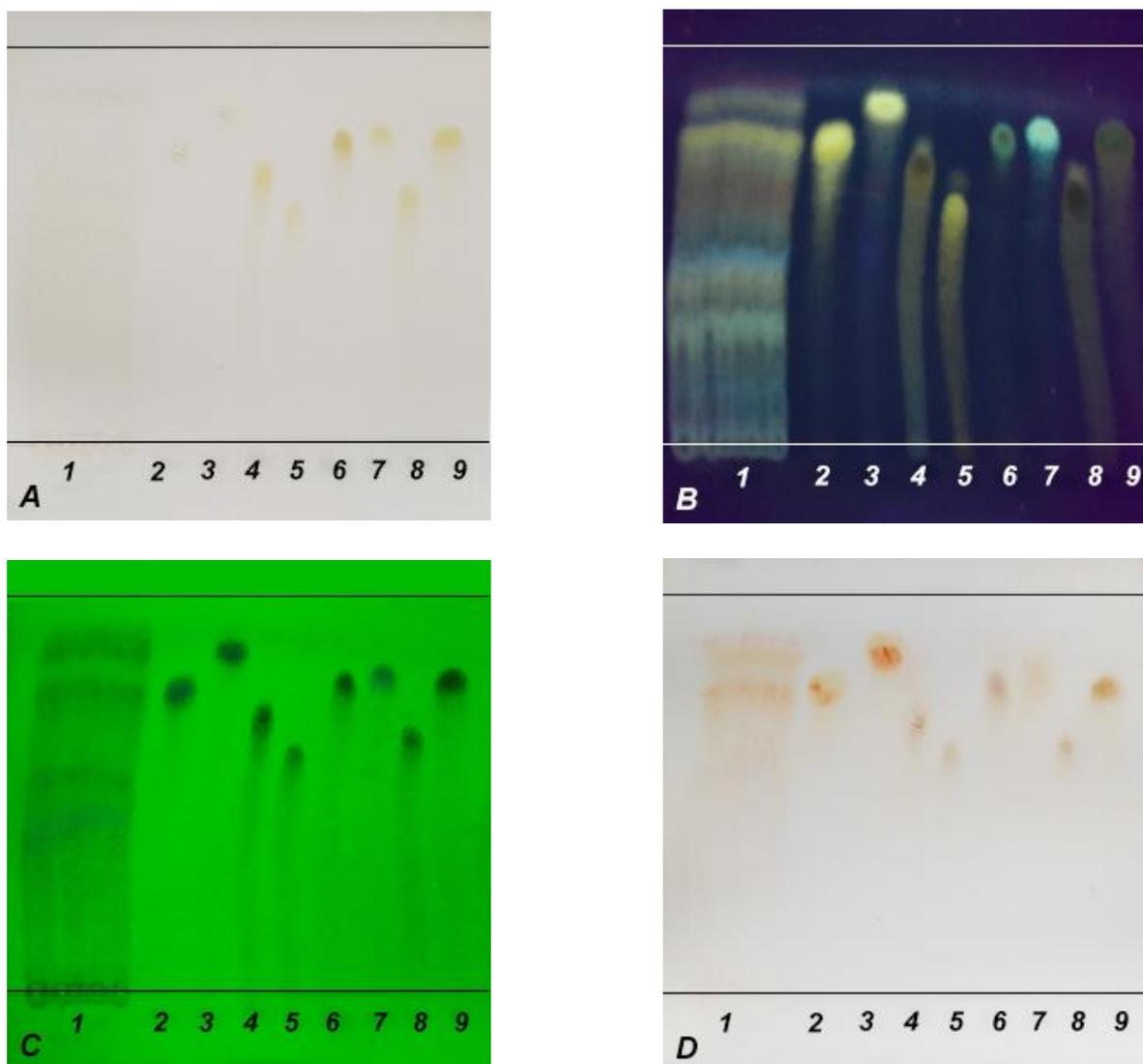


Рисунок 27 – Хроматограммы *Achillea millefolium* L. (система хлороформ-этанол-вода (25:18:2)): А – видимый свет; В – с добавлением $AlCl_3$ (УФ-свет при $\lambda=365$ нм); С – с добавлением $AlCl_3$ (УФ-свет при $\lambda=254$ нм); D – после обработки раствором ДСК.

Обозначения: 1 – *A. millefolium*; 2 – апигенин; 3 – космосин; 4 – цинарозид; 5 – СО рутина; 6 – СО кверцетина; 7 – СО кемферола; 8 – СО цинарозида; 9 – СО лютеолина.

При сравнительном анализе в присутствии образцов стандартных флавоноидов подтверждено наличие космосина, апигенина и цинарозида во всех образцах (рис. 28).

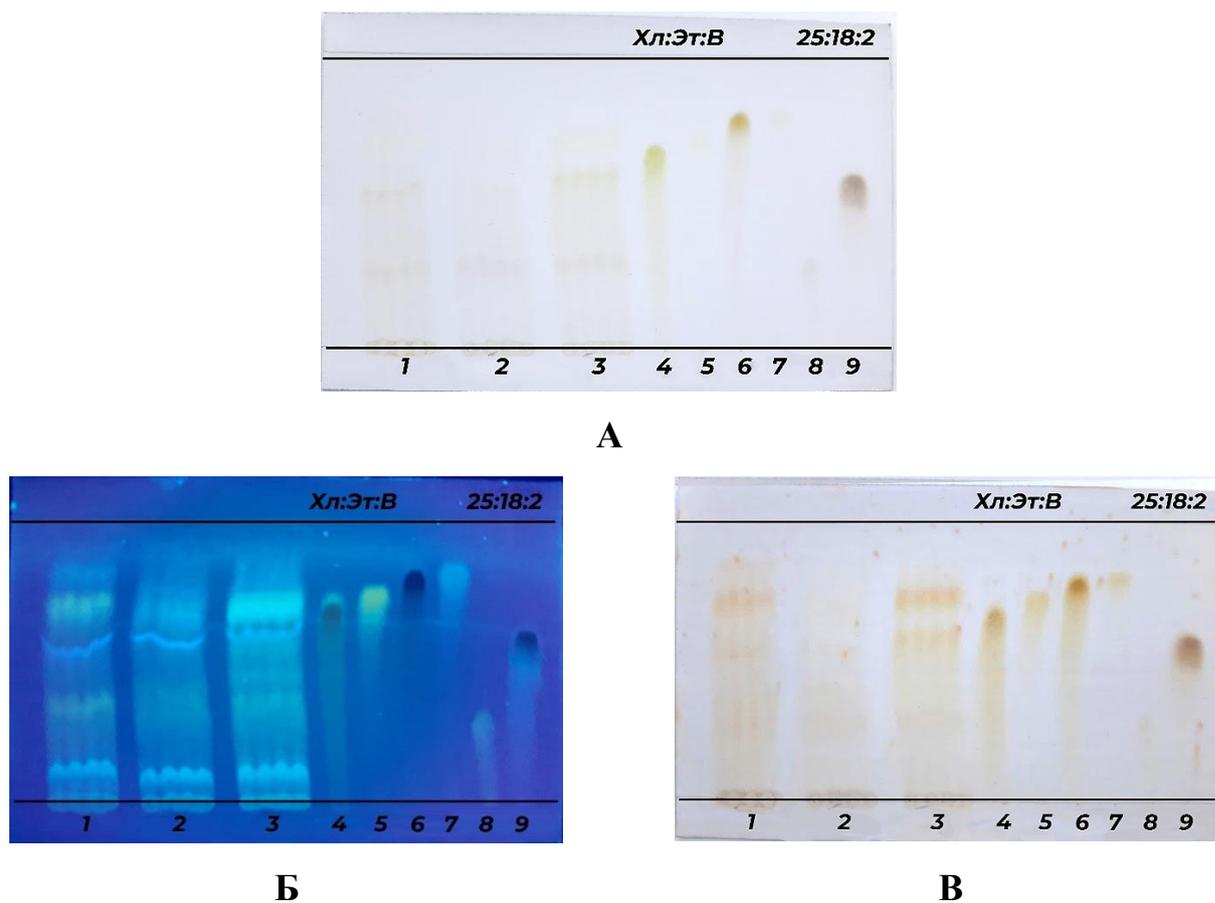


Рисунок 28 – Хроматограммы водно-спиртовых извлечений видов рода *Achilléa* L. (система хлороформ-этанол-вода (25:18:2)): А – видимый свет, Б – с добавлением $AlCl_3$ (УФ-свет при $\lambda=365$ нм), В – с добавлением щелочного р-ра ДСК.

Обозначения: 1 – *A. millefolium*; 2 – *A. cartilaginea*; 3 – *A. nobilis*; 4 – цинарозид; 5 – космосиин; 6 – лютеолин; 7 – апигенин; 8 – хлорогеновая кислота; 9 – кофейная кислота.

Методика проведения подлинности методом ТСХ: около 1,0 г сырья, измельченного до величины частиц 3 мм, помещают в колбу коническую со шлифом 100 мл, прибавляют 10 мл этанола 70%, проводят нагрев с обратным холодильником на бане кипящей водной в течение 30 мин. После охлаждения до комнатной температуры раствор фильтруют через бумажный фильтр (испытуемый раствор).

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

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

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

На линию старта аналитической хроматографической пластики со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемого раствора и параллельно 5 мкл растворов образцов сравнения космосиина, апигенина и цинарозида. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре (5 мин), помещают в камеру, предварительно насыщенную не менее 60 минут смесью растворителей хлороформ – этиловый спирт 96% – вода (25:18:2) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителя пройдет около 80-90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителя, обрабатывают 3% спиртовым раствором алюминия хлорида, сушат в сушильном шкафу при температуре 100-105 °С в течение 3-5 мин и просматривают в УФ-свете при $\lambda=366$ нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: зона адсорбции с флуоресценцией желтого цвета с $R_f \approx 0,6$ на уровне зоны СО космосиина, зона адсорбции с лимонно-желтой флуоресценцией с $R_f \approx 0,8$ на уровне зоны СО апигенина, зона адсорбции с желтой или желто-зеленой флуоресценцией с $R_f \approx 0,7$ на уровне зоны СО цинарозида.

5.2. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчёте на цинарозид и абсолютно сухое сырьё

Для целей совершенствования методики количественного анализа суммы флавоноидов в траве *Achillea millefolium* проведен анализ УФ-спектров растворов водно-спиртовых извлечений, а также растворов выделенных флавоноидов.

В итоге эксперимента наблюдается батохромный сдвиг длинноволновой полосы флавоноидов (рис. 29), как и в случае цинарозида (рис. 31). При анализе УФ-спектров СО цинарозида обнаружено, что раствор данного стандарта в присутствии раствора $AlCl_3$ имеет максимум поглощения при $\lambda=400$ нм (рис. 32). УФ-спектр водно-спиртового извлечения из травы *A. millefolium* в дифференциальном

варианте позволил выявить максимум поглощения при $\lambda=400$ нм (рис. 30), который практически соответствует максимуму цинарозида. Результаты данных исследований свидетельствуют о возможности исключения из фармакопейной методики процесса кислотного гидролиза флавоноидных гликозидов на стадии экстракции целевых веществ в траве *Achillea millefolium*.

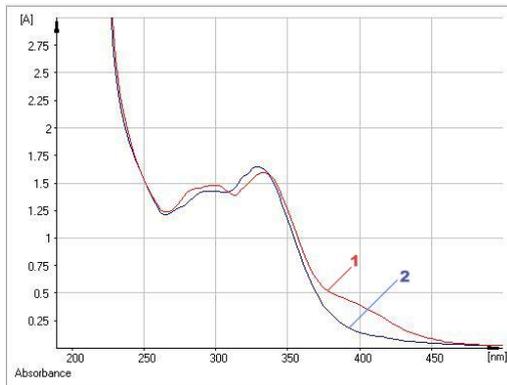


Рисунок 29 – УФ-спектры поглощения водно-спиртового извлечения из травы *A.millefolium* (1) и извлечения в присутствии $AlCl_3$ (2)

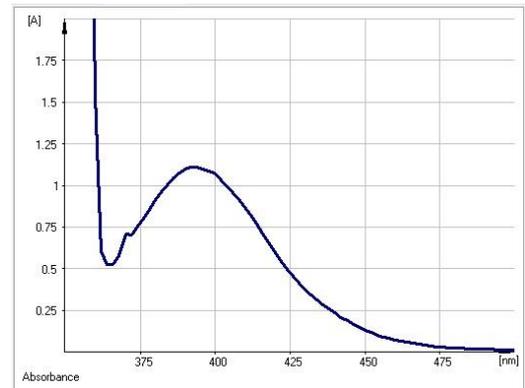


Рисунок 30 – УФ-спектры поглощения раствора водно-спиртового извлечения из травы *A.millefolium* (дифференциальный спектр)

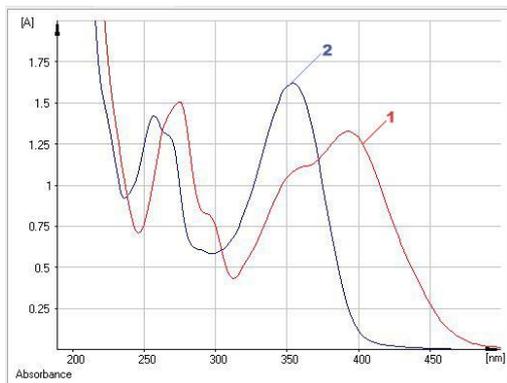


Рисунок 31 – Электронные спектры поглощения раствора цинарозида (1) и раствора цинарозида в присутствии $AlCl_3$ (дифференциальный спектр) (2)

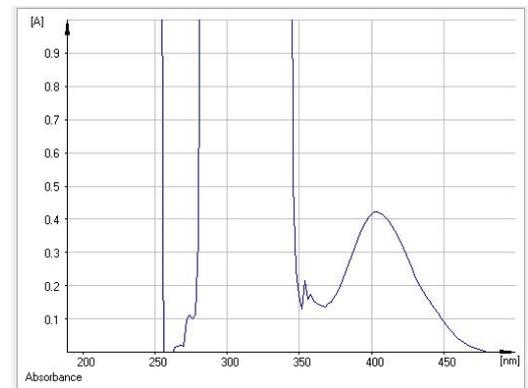


Рисунок 32 – Спектральная кривая поглощения раствора цинарозида

Далее нам был проведен ряд исследований для подбора наиболее оптимальных условий экстрагирования сырья для более точного анализа суммы флавоноидов в траве тысячелистника обыкновенного. Были исследованы такие

параметры как концентрация этанола (в %), Т экстракции на бане кипящей водной (в мин.), размер частиц сырья (в мм.), соотношение частей сырья к части экстрагента. Результаты анализирования воздействия разнородных факторов экстракции на экстракцию действующих веществ из сырья представлен в таблице 11.

Параметры экстракции, которые обеспечивают оптимальные условия для проведения процесса извлечения суммы флавоноидов в *A. millefolium*, приведены в таблице 19.

Таблица 19 – Параметры экстракции, которые обеспечивают оптимальные условия для проведения процесса извлечения суммы флавоноидов в траве *A. millefolium*

Концентрация этанола, %	Т экстракции, мин	Размер частиц сырья, мм	Соотношение «сырье:экстрагент»	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид и а.с.с., %
Экстрагент				
40	45	2	1:30	0,220 ± 0,01
50	45	2	1:30	0,540 ± 0,02
60	45	2	1:30	0,450 ± 0,02
70	45	2	1:30	0,440 ± 0,02
80	45	2	1:30	0,250 ± 0,01
96	45	2	1:30	0,160 ± 0,01
Время экстрагирования				
50	30	2	1:30	0,420 ± 0,02
50	45	2	1:30	0,540 ± 0,02
50	60	2	1:30	0,530 ± 0,03
50	90	2	1:30	0,510 ± 0,02
50	120	2	1:30	0,370 ± 0,02
Размер частиц сырья				
50	45	1	1:30	0,770 ± 0,03
50	45	2	1:30	0,540 ± 0,02
50	45	3	1:30	0,490 ± 0,02

Соотношение сырье:экстрагент				
50	45	2	1:20	0,340 ± 0,02
50	45	2	1:30	0,540 ± 0,02
50	45	2	1:50	0,490 ± 0,02
Итого: размер частиц 2 мм, однократное извлечение 50% этанолом на кипящей водяной бане в течение 45 мин в соотношении «сырье-экстрагент» - 1:30				

В таблице 20 представлены параметры проведения стандартизации травы *A. millefolium* методом дифференциальной спектрофотометрии.

Таблица 20 – Параметры проведения количественного анализа суммы флавоноидов в траве тысячелистника обыкновенного

Метод исследования	Дифференциальная спектрофотометрия
Исследуемый объект	<i>Achillea millefolium</i> L.
Размер частиц сырья, мм	2,0
Масса навески, г	1,0
Экстрагент	Спирт этиловый (50%)
Соотношение «Сырье:экстрагент»	1:30
Метод экстракции	Экстракция однократная на бане кипящей водяной с подключением обратного холодильника
Время экстрагирования, мин	45
Условия фильтрования извлечения	После охлаждения извлечения до T=25°C через бумажный фильтр (красная полоса)
Испытуемый раствор	2 мл анализируемого извлечения помещают в мерную колбу на 25 мл, добавляют 2 мл 3% спиртового раствора AlCl ₃ , доводят объем до метки этанолом 96%
Раствор сравнения	2 мл анализируемого извлечения помещают в мерную колбу на 25 мл, доводят объем до метки этанолом 96%

Стандартный образец	Цинарозид
Приготовление раствора стандарта: - навеска - объем мерной колбы - растворитель.	- 0,05 г. - 25 мл. - спирт этиловый 50%.
Испытуемый раствор СО	Помещают в мерную колбу на 25 мл 2 мл раствора СО цинарозида, добавляют 2 мл 3% спиртового раствора $AlCl_3$, доводят объем до метки 96% этанолом
Раствор сравнения СО	2 мл полученного раствора СО цинарозида помещают в мерную колбу на 25 мл, доводят объем до метки 96% этанолом
Время ожидания комплекса с раствором $AlCl_3$	40 мин
Измеряемая величина	Оптическая плотность
Длина волны, при которой наблюдается максимум поглощения	400 нм.

Методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид и абсолютно сухое сырьё: 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 100 мл, добавляют 30 мл 50% этанола. Колбу прикрывают пробкой и взвешивают на тарирных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и экстрагируют на бане кипящей водной (умеренное кипение) в течение 45 мин. Затем ее охлаждают в течение 30 мин, прикрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной

массы. Проводят фильтрацию извлечения с помощью бумажного фильтра (красная полоса).

Определяемый раствор готовят следующим образом: 2 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, добавляют 2 мл 3% спиртового раствора $AlCl_3$ и доводят объем раствора до метки этанолом 96%.

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

Для определения содержания суммы флавоноидов проводят подготовку раствора СО цинарозида, прибавляют к нему 2 мл 3% спиртового раствора $AlCl_3$, проводят определение оптической плотности окрашенного комплекса при $\lambda=400$ нм; определенное значение 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% этанола при нагревании на бане водной. 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 $AlCl_3$ и доводят объем раствора до метки этанолом 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 этанолом 96%.

Измерение оптической плотности проводят через полчаса после приготовления растворов при $\lambda=400$ нм.

В ходе сравнительного спектрофотометрического анализа водно-спиртовых извлечений травы тысячелистника обыкновенного, хрящеватого и благородного (рис. 33-38) обнаружено, что кривая поглощения их УФ-спектров обусловлена в основном гидроксикоричными кислотами, в частности, хлорогеновой и кофейной

кислотами (290 нм и 330 нм). Добавление раствора $AlCl_3$ позволило обнаружить батохромный сдвиг длинноволновой полосы при $\lambda=400$ нм (флавоноиды).

В условиях дифференциальной спектрофотометрии (рис. 34, 36, 38) в УФ-спектрах видов рода *Achillea* L. обнаружен максимум поглощения при 400 ± 2 нм, что характерно для флавонов, в частности, апигенина, лютеолина и их глюкозидов (космосиин, цинарозид и др.) (рис. 39, 40).

Изучение УФ-спектров раствора космосиина (рис. 39), являющегося доминирующим флавоноидом травы *A.millefolium*, позволило выявить максимум поглощения при длине волны 340 ± 2 нм. Сопоставимые спектральные характеристики имеет и цинарозид (рис. 40).

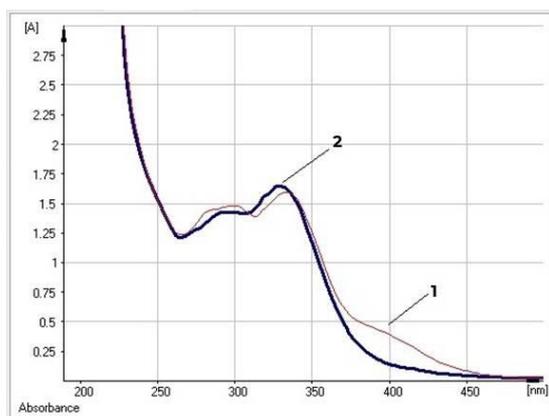


Рис. 33. УФ-спектры поглощения р-ра водно-спиртового извлечения из травы *A.millefolium* (1) и извлечения в присутствии $AlCl_3$ (2)

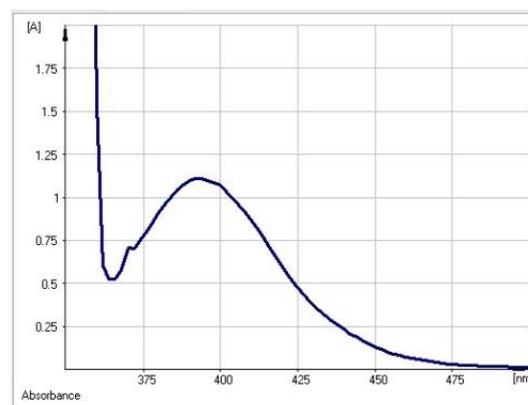


Рис. 34. УФ-спектры поглощения р-ра водно-спиртового извлечения из травы *A.millefolium* (дифференциальный спектр)

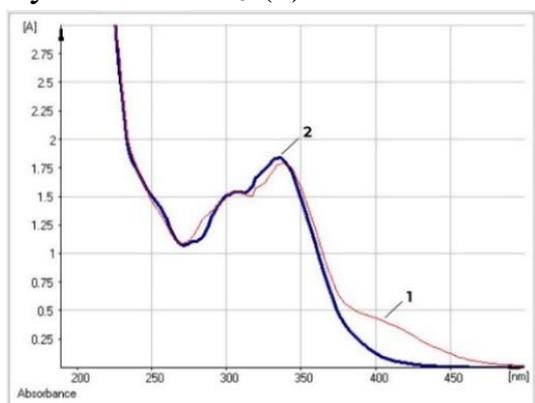


Рис. 35. УФ-спектры поглощения р-ра водно-спиртового извлечения из травы *A.cartilaginra* (1) и извлечения в присутствии $AlCl_3$ (2)

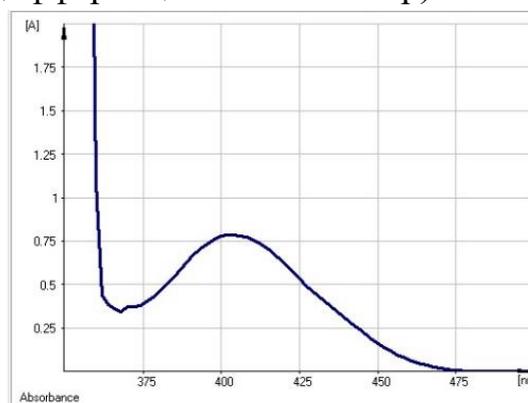


Рис. 36. УФ-спектры поглощения р-ра водно-спиртового извлечения из травы *A.cartilaginra* (дифференциальный спектр)

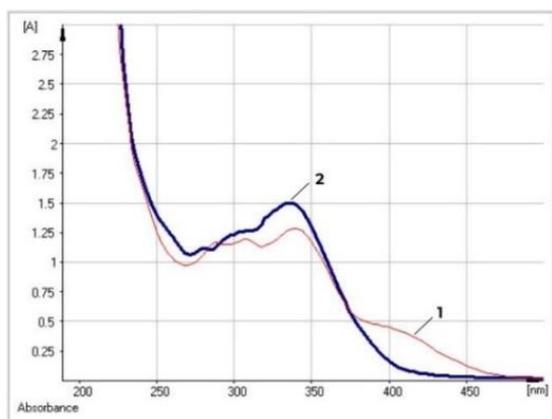


Рис. 37. УФ-спектры поглощения р-ра водно-спиртового извлечения из травы *A.noblis* (1) и извлечения в присутствии $AlCl_3$ (2)

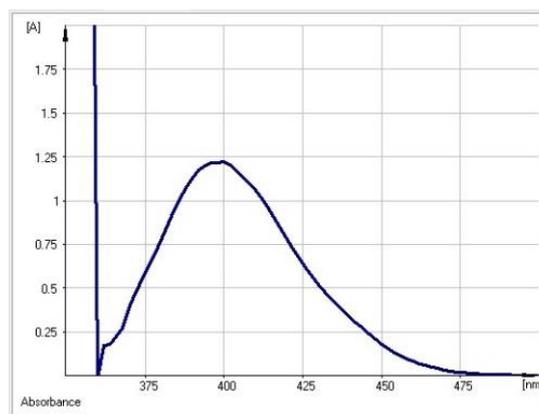


Рис. 38. УФ-спектры поглощения р-ра водно-спиртового извлечения из травы *A.noblis* (дифференциальный спектр)

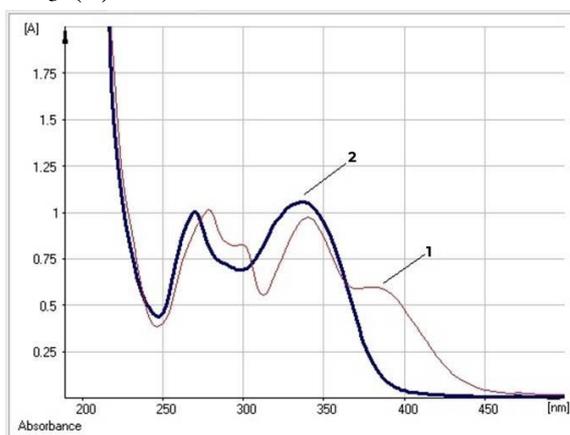


Рис. 39. УФ-спектры поглощения р-ра космосиина (1) и р-ра космосиина в присутствии $AlCl_3$ (2).

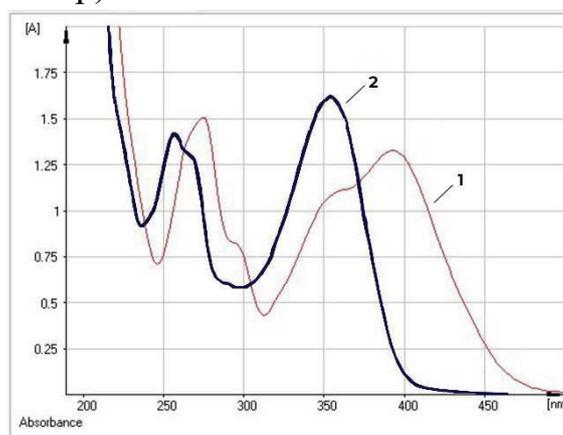


Рис. 40. УФ-спектры поглощения р-ра цинарозида (1) и р-ра цинарозида с добавлением алюминия хлорида (2).

Совокупность полученных данных позволяет считать возможным определение количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид при $\lambda=400$ нм.

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 р-ра анализируемого образца;

D_0 – оптическая плотность р-ра СО цинарозида;

m – навеска сырья, г;

m_0 – навеска СО цинарозида, г;

30 – объём извлечения, мл;

25 – объём колбы для приготовления р-ра А р-ра анализируемого образца, мл;

2 – объём аликвоты для приготовления р-ра А СО цинарозида, г;

100 – содержание основного вещества в стандартном образце цинарозида, %;

25 – объём стандартного образца цинарозида, мл;

25 – объём колбы для приготовления р-ра А СО цинарозида, мл;

2 – объём аликвоты извлечения для приготовления р-ра А р-ра анализируемого образца, мл;

W – потеря в массе при высушивании, %.

В случае отсутствия СО цинарозида в расчетах целесообразно применение теоретического значения удельного показателя поглощения при 400 нм – 340:

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

где D – оптическая плотность анализируемого р-ра;

m – навеска сырья, г;

m_0 – навеска СО цинарозида, г;

30 – объём извлечения, мл;

25 – объём колбы для приготовления р-ра А анализируемого р-ра, мл;

m – масса сырья, г;

340 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) СО цинарозида при 400 нм;

2 – объём аликвоты извлечения для приготовления р-ра А анализируемого р-ра, мл;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Метрологические параметры разработанной методики приведены в таблице

21.

Таблица 21 – Метрологические параметры методики определения количественного содержания суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид и а.с.с., %

n	f	\bar{X}	S	$S_{\bar{X}}$	P(%)	T(P, t)	ΔX	$\Delta \bar{X}$	E, %
11	10	0,41	0,012	0,00015	95,00%	2,23	$\pm 0,027$	0,008	$\pm 6,7$

Оценка валидации разработанной методики проводилась по параметрам: линейность, специфичность, правильность, воспроизводимость. Специфичность методики – по соответствию максимумов поглощения комплекса флавоноидов травы *A. millefolium* и СО цинарозид с $AlCl_3$ (рис. 41). Линейность проверена для серии растворов СО цинарозида (с концентрациями в диапазоне от 0,00220 до 0,0110 мг/мл). Коэффициент корреляции – 0,9979.

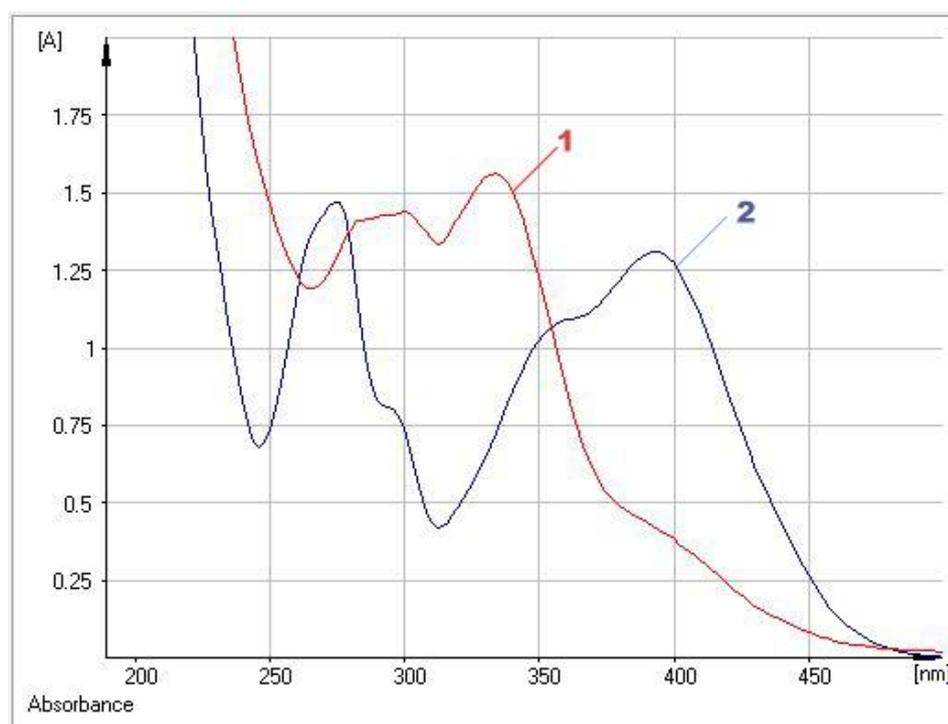


Рис. 41. УФ-спектры поглощения извлечения из *A. millefolium* в присутствии $AlCl_3$ (1) и раствора СО цинарозида в присутствии $AlCl_3$ (2)

Анализ по спроектированной методике позволил получить следующие данные (табл. 22):

Таблица 22 – Определение содержания суммы флавоноидов в образцах травы *A.millefolium*

№ п/п	Характеристика образца <i>A.millefolium</i>	Содержание суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид и а.с.с., %
1.	Самарская область (июль 2020 г.)	0,540±0,020
2.	Оренбургская область (июль 2021 г.)	0,740±0,030
3.	Республика Татарстан (июль 2021 г.)	0,510±0,020
4.	АО «Красногорсклексредства»	0,710±0,030

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 в пересчете на цинарозид, причём с сохранением текущего числового показателя – суммы флавоноидов не менее 0,4 % в соответствии с ФС.2.5.0101.18 «Тысячелистника обыкновенного трава» Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания.

5.3. Определение содержания космосина методом ВЭЖХ

Был проведён предварительный анализ состава компонентов травы *A.millefolium* с использованием метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). В целях проведения анализа использованы извлечения из травы *A.millefolium*. Водно-спиртовые извлечения были получены в условиях, описанных ранее. Проведена дополнительная фильтрация мембранным фильтром Milipor (0,45 мкм).

Приготовление раствора СО космосиина: точную навеску (3 мг) предварительно высушенного космосиина (содержание основного вещества 91%) перенесли в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворили в 96% этаноле и довели объем раствора до метки тем же растворителем.

Параметры хроматографического анализа с использованием системы ацетонитрил – вода, а также градиентный профиль хроматографического разделения представлены в Главе 2.

Как уже упоминалось ранее, доминирующий флавоноид космосиин имеет значительное влияние на кривую поглощения извлечения из травы *A.millefolium* в $\lambda=330-350$ нм. Данный длинноволновой максимум использован в качестве аналитической длины волны в методике качественного анализа данного флавоноида, а также при изучении компонентного состава травы тысячелистника обыкновенного, хрящеватого и 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 *A.millefolium* в перечисленных условиях обнаружены: хлорогеновая кислота, цинарозид, космосиин, апигенин и лютеолин (рис. 42-44).

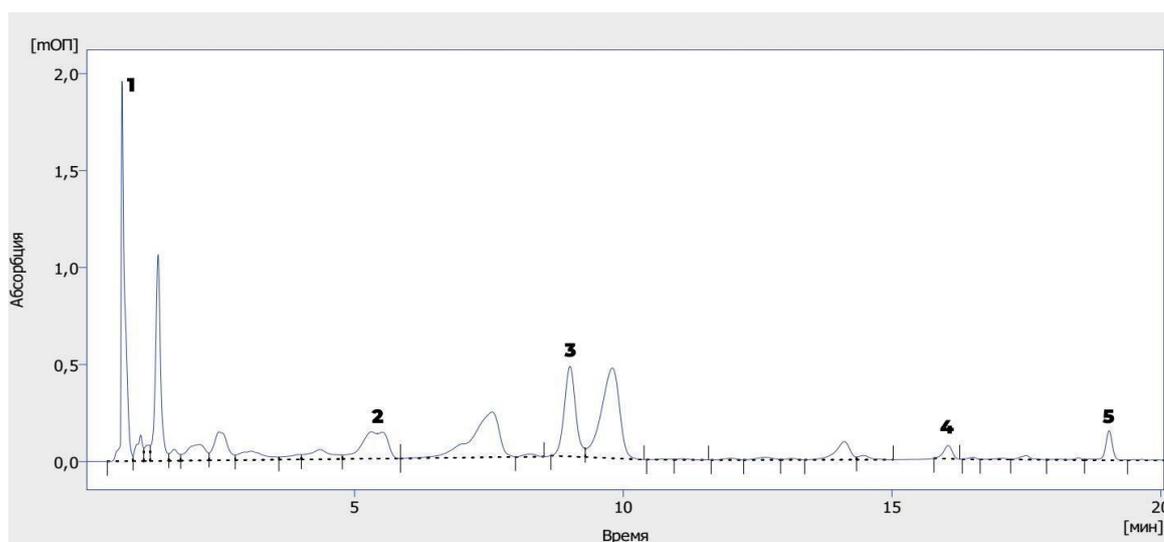


Рисунок 42 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из травы *A.millefolium*
 Обозначения: 1 – хлорогеновая кислота; 2 – цинарозид; 3 – космосиин; 4 – лютеолин; 5 – апигенин.

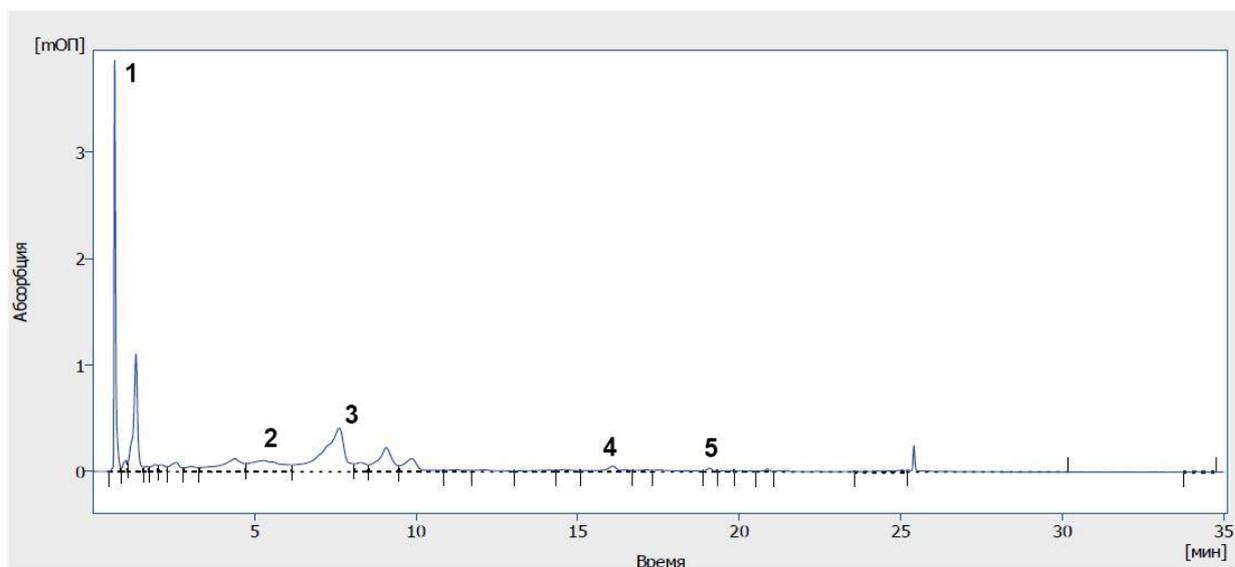


Рисунок 43 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из травы *A. cartilaginea*
 Обозначения: 1 – хлорогеновая кислота; 2 – цинарозид; 3 – космосин; 4 – лютеолин; 5 – апигенин.

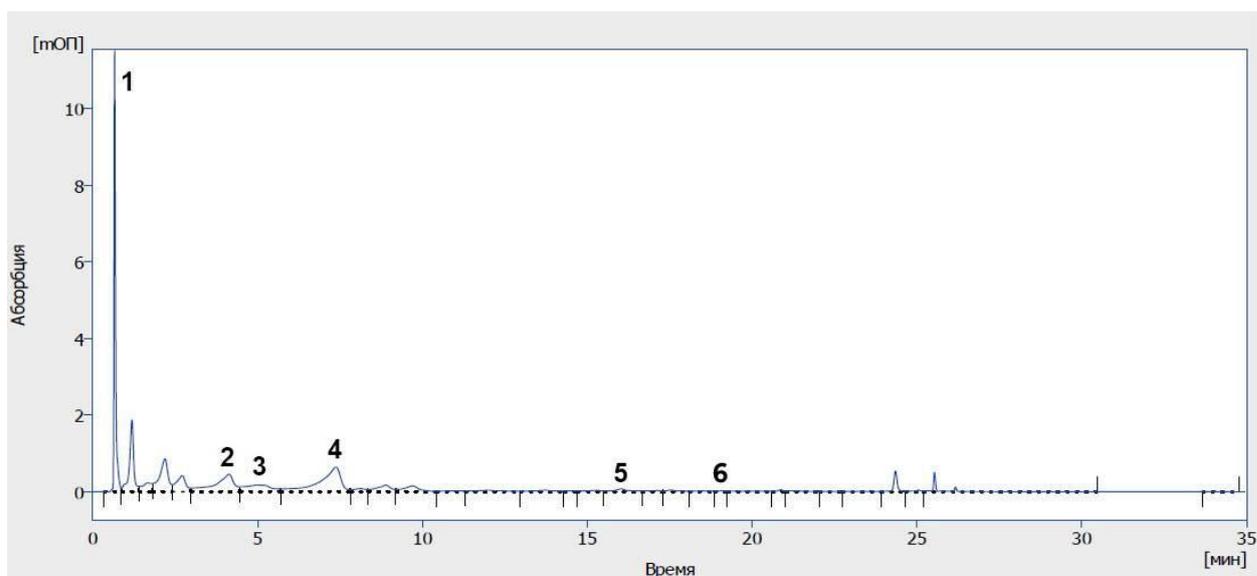


Рисунок 44 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из травы *A. nobilis*
 Обозначения: 1 – хлорогеновая кислота; 2 – кофейная кислота;
 3 – цинарозид; 4 – космосин; 5 – лютеолин; 6 – апигенин.

Кроме того, в водно-спиртовом извлечении травы тысячелистника благородного выявлено наличие кофейной кислоты. Время удерживания пиков отражены в таблице 23.

Таблица 23 – Время удерживания пиков на хроматограммах извлечений и СО

Вещества	Время удерживания на хроматограмме, мин			
	Стандартные образцы	<i>A.millefolium</i>	<i>A.cartilaginea</i>	<i>A.nobilis</i>
Хлорогеновая кислота (1)	1.35	1.34	1.32	1.18
Кофейная кислота (2)	-	-	-	2,19
Цинарозид (2)	5.55	5.48	5.29	4.99
Космосиин (3)	9.02	9.01	9.07	8.89
Лютеолин (4)	16.01	16.05	16.09	16.03
Апигенин (5)	19.04	19.15	19.07	19.07

Зависимость высоты и площади хроматографического пика от концентрации космосиина описывалась линейной регрессией в диапазоне концентраций от 0,016 до 0,076 мг/мл (рис. 45); коэффициент корреляции для зависимости высоты пика от концентрации космосиина составил 0,9561, для зависимости площади пика от концентрации – 0,9996. Поэтому количественный анализ космосиина проведен с применением S пика.

С целью определения специфичности методики было проведено сравнение времени удерживания СО космосиина и пика на хроматограмме извлечения. Для оценки линейности построен градуировочный график серий разведения космосиина (в диапазоне концентраций от 0,016 до 0,076 мг/мл). На основании полученных данных построен график в координатах «С, мг/мл – S пика». Рассчитывали уравнение линейной регрессии ($Y = aX + b$), значение коэффициента детерминации (R^2), стандартное отклонение с использованием программы Microsoft Excel 2016.

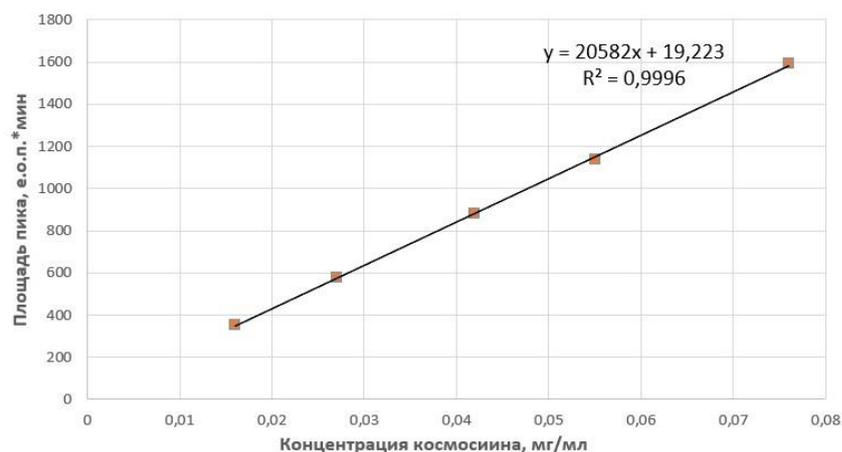


Рисунок 45 – График зависимости S пика от C космосиина в пробе и уравнение линейной регрессии

Правильность методики определяли на образце извлечения травы *Achillea millefolium* путём введения аликвоты образца раствора СО космосиина в кол-ве от 80% до 120% от исходного содержания.

При добавлении образца раствора СО космосиина в водно-спиртовое извлечение на хроматограмме наблюдается рост интенсивности пика космосиина по сравнению с пиком в исходном анализируемом растворе (рис. 46).

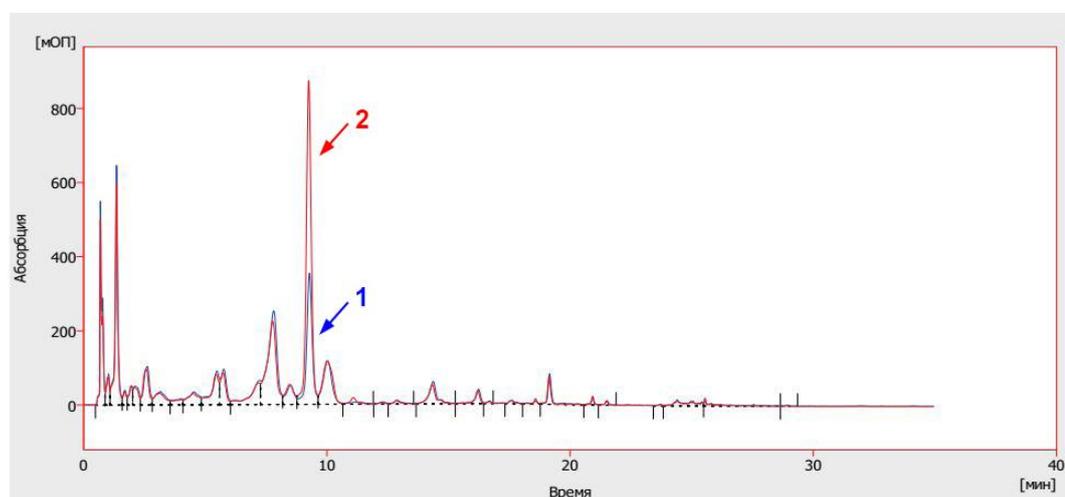


Рисунок 46 – ВЭЖХ-хроматограмма извлечения из травы *Achillea millefolium* с добавлением космосиина.

Обозначения: 1 – извлечение травы *Achillea millefolium*; 2 – извлечение травы *Achillea millefolium* после добавления СО космосиина.

Таким образом возможно проведение качественного анализа (определение флавоноидов и гидроксикоричных кислот) травы тысячелистника методом ВЭЖХ.

Для определения пригодности хроматографической системы проводили 5-кратное хроматографирование 10 мкл раствора извлечения травы *A. millefolium*. Далее проведен расчёт следующих показателей: разрешение между пиками, эффективность колонки, фактор асимметрии.

В результате были получены следующие параметры (табл. 24).

Таблица 24 – Оценка пригодности колонки для хроматографии

Параметр хроматографической колонки	Значение	Нормативный показатель
Эффективность колонки	8747	Не менее 5000 теоретических тарелок
Разрешение между наиболее близкими пиками	1,75	Не менее 1,5
Фактор асимметрии	1,09	Не более 1,5

Таким образом, представленные данные позволяют провести оценку пригодности данной хроматографической системы, а также сделать вывод, что хроматографическая система может быть использована для количественного определения космосиина в траве *A. millefolium*.

Методика количественного определения космосиина в траве тысячелистника обыкновенного. 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	20,40 → 40,0	79,60 → 60,0	Линейный градиент
22-25	40,0 → 80,0	80,0 → 20,0	Линейный градиент
25-35	80	20	Изократический

Проводят УФ-детектирование при $\lambda=340$ нм, диапазон чувствительности 0,5.

Проводят не менее 3 параллельных определений.

10 мкл раствора космосиина параллельно 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, %.

По спроектированной методике получены следующие значения содержания космосиина в исследуемых образцах (табл. 25).

Таблица 25 – Содержание космосиина в траве тысячелистника обыкновенного

№ п/п	Образец	Содержание космосиина (%)
1	Трава тысячелистника обыкновенного (Самарская область)	0,61±0,01
2	Трава тысячелистника обыкновенного (Республика Татарстан)	0,66±0,02
3	Трава тысячелистника обыкновенного (Оренбургская область)	0,52±0,01

Ошибка единичного определения содержания космосиина в траве *A. millefolium* с доверительной вероятностью 95% составляет ±5,28% (табл. 26).

Таблица 26 – Метрологические характеристики методики количественного определения космосиина в траве *A. millefolium*

Образец	f	X_{cp}	S	$P, \%$	$t(P,f)$	ΔX	$E, \%$
Водно-спиртовое извлечение из <i>Achillea millefolium</i>	10	0,621	0,1087	95	2,23	±0,0327	±5,2800

Таким образом, подтверждена целесообразность стандартизации травы *A. millefolium* путем определения содержания космосиина как доминирующего и диагностически значимого флавоноида с использованием метода ВЭЖХ и детектированием на УФ-детекторе при $\lambda=340$ нм.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 5

1. Выполнен анализ компонентного состава травы тысячелистника с применением метода ТСХ. Наиболее информативными явились хроматограммы, полученные в системе растворителей хлороформ – этанол 96% – вода (25:18:2) с детекцией при $\lambda=366$ нм до и после нанесения спиртового раствора $AlCl_3$.
2. В свою очередь сравнительный хроматографический анализ позволил обнаружить присутствие доминирующих флавоноидов (космосиина, апигенина и цинарозида) в водно-спиртовых извлечениях из травы тысячелистника обыкновенного, хрящеватого и благородного.
3. Разработана методика определения подлинности травы тысячелистника обыкновенного методом ТСХ.
4. Разработана методика количественного анализа суммы флавоноидов в траве *A.millefolium* в пересчете на доминирующий флавоноид – цинарозид.
5. 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. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о целесообразности стандартизации травы *A.millefolium* путем определения содержания доминирующего и диагностически значимого флавоноида – космосиина с использованием метода ВЭЖХ и детектированием на УФ-детекторе при $\lambda=340$ нм.

ГЛАВА 6. ИЗУЧЕНИЕ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГУСТОГО ЭКСТРАКТА И ФЛАВОНОИДОВ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ ТРАВЫ ТЫСЯЧЕЛИСТНИКА ОБЫКНОВЕННОГО

С целью анализа фармакологической активности препаратов травы тысячелистника обыкновенного нами был получен густой экстракт из этого вида сырья (табл. 27).

Таблица 27 – Стадии получения густого экстракта методом дробной модифицированной мацерации

Этапы	Описание технологических операций
Получение жидкого экстракта. Первый день.	Помещали по 1-ой части измельченного сырья в заранее подготовленные колбы (3 шт.). 1-ую колбу заполнили 10 объёмами этанола 70% (для замачивания и экстракции сырья), настаивали в течение 24ч при T=25°C. Во 2-ую колбу поместили 2V этанола 70% для замачивания сырья в течение 24 ч.
Получение жидкого экстракта. Второй день.	Полученное извлечение из 1-ой колбы перенесли во 2-ую колбу, оставляли в течение 24 ч при T=25°C. В 1-ую колбу прибавили 250 мл экстрагента для настаивания в течение 1 суток, в 3-ю колбу – 100 мл на замачивание сырья.
Получение жидкого экстракта. Третий день.	Извлечение из 2-ой колбы переносили в 3-ю, а из 1-ой – во 2-ую. 5 объёмов чистого экстрагента (этанола 70%) прибавили в 1-ую колбу и оставили на 24ч при T=25°C для замачивания.
Получение жидкого экстракта. Четвертый день.	Извлечение, полученное в 3-ей колбе, собрали в отдельную экстрактивную колбу (1/3 от общего объема). Извлечение из 2-ой колбы перенесли в 3-ю. 1-ую колбу поместили на кипящую водяную баню в течение 30 минут с обратным холодильником для термической экстракции. После охлаждения до комнатной температуры извлечение

	переносили во 2-ую колбу. Сырье из 1-ой колбы отнесли к отработанному.
Получение жидкого экстракта. Пятый день.	Дополнительную часть готовой продукции получили из 3-ей колбы, перенесли в колбе для экстракта. Содержимое 2-ой колбы в течение получаса подвергли термической экстракции, аналогичной том, что проходила в 4-ый день. Охлажденное до комнатной температуры извлечение из 2-ой колбы перенесли в 3-ю колбу и оставили на 24 ч при T=25°C. Сырье из 2-ой колбы отнесли к отработанному.
Получение жидкого экстракта. Шестой день.	3-ю колбу поместили на баню кипящую водную с обратным холодильником, проводили термическую экстракцию в течение 30 мин. Извлечение после охлаждения перенесли в колбу для готового экстракта. Сырье в 3-ей колбе отнесли к отработанному.
Очистка.	Методом отстаивания при температуре не выше 10°C в течение 2 суток и последующей фильтрацией осуществляли очистку вытяжки.
Получение густого экстракта.	Получали из экстракта жидкого с помощью упаривания на водной бане при T=100°C.

Помимо густого экстракта были исследованы доминирующие флавоноиды, выделенные из травы тысячелистника обыкновенного – космосин, апигенин и цинарозид, с целью изучения их предполагаемой диуретической и антимикробной активности, свойственных группе БАС – флавоноидами.

6.1. Изучение диуретической активности густого экстракта и флавоноидов травы тысячелистника обыкновенного

Однократное внутрижелудочное введение апигенина в дозе 1 мг/кг позволило отметить достоверное изолированное снижение креатининурина (на 57%) в опытной группе относительно водного контроля за 4 ч опыта, за 24 ч достоверных

изменений анализируемых показателей экскреторной функции почек в опытной группе относительно контроля отмечено не было.

При однократном внутривенном введении лютеолина в дозе 1 мг/кг за 24 ч достоверных изменений анализируемых параметров экскреторной функции почек в группе опыта относительно контрольной отмечено не было, однако за 24 ч опыта отмечалось достоверное изолированное снижение креатининурина (45%) в опытной группе по сравнению с водным контролем. В свою очередь при 1-кратном введении внутривенным зондом цинарозида (1 мг/кг) за 24 часа обнаружено достоверное изолированное повышение креатининурина (на 47%) в группе опыта по сравнению с водным контролем.

Таблица 28 – Воздействие внутривенного введения апигенина, космосиина, лютеолина в дозе 1 мг/кг на экскреторную функцию почек интактных крыс при эксперименте за 4 ч и 24 ч, %

Время, ч	Показатели	Контроль	Апигенин, 1 мг/кг	Космосиин, 1 мг/кг	Лютеолин, 1 мг/кг
4	Диурез, %	100%	95%	109%	93%
	Экскреция креатинина, %	100%	43%	86%	71%
24	Диурез, %	100%	102%	104%	86%
	Экскреция креатинина, %	100%	76%	73%	55%

В 4-х часовых и суточных экспериментах достоверных изменений диуреза и креатининурина в опытных группах, получавших космосиин в дозе 1 мг/кг, а также густой экстракт тысячелистника в дозе 10 мг/кг, отмечено не было.

Таблица 29 – Воздействие внутривенного введения ГЭ тысячелистника в дозе 10 мг/кг на экскреторную функцию почек в 2 ч и 24 ч эксперименте, %

Время, ч	Показатели	Контроль	ГЭ тысячелистника, 10 мг/кг
4	Диурез, %	100%	117%
	Экскреция	100%	82%

	креатинина, %		
24	Диурез, %	100%	100%
	Экскреция креатинина, %	100%	76%

6.2. Изучение нейротропной активности густого экстракта тысячелистника и флавоноидов, выделенных из травы тысячелистника обыкновенного

Однократное внутрижелудочное введение апигенина в дозе 1 мг/кг позволило отметить достоверное снижение двигательной активности опытных животных относительно водного контроля (на 65%). Следовательно, апигенин в дозе 1 мг/кг обладает седативным действием.

В то же время, однократное введение внутрижелудочным зондом космосиина в дозе 1 мг/кг позволило выявить достоверное понижение двигательной активности группы опыта относительно водного контроля (на 40%). Таким образом, космосиин в дозе 1 мг/кг обладает седативным действием.

В свою очередь, однократное внутрижелудочное введение цинарозида в дозе 1 мг/кг позволило отметить достоверное снижение двигательной активности опытных животных относительно водного контроля (на 74%). Следовательно, цинарозид в дозе 1 мг/кг обладает седативным действием.

Однако, однократное внутрижелудочное введение лютеолина в дозе 1 мг/кг не выявило достоверных изменений двигательной активности группы опыта относительно контроля.

Наряду с этим, однократное введение внутрижелудочным зондом густого экстракта тысячелистника в дозе 1 мг/кг позволило обнаружить достоверное понижение двигательной активности опытных животных относительно водного контроля (на 88%). Таким образом, густой экстракт тысячелистника в дозе 1 мг/кг обладает седативным действием.

Таблица 30 – Изучение нейротропной активности густого экстракта тысячелистника и флавоноидов, выделенных из травы тысячелистника обыкновенного

Двигательная активность животных за 5 мин, с					
Контроль Вода	Опыт 1 Апигенин, 1 мг/кг	Опыт 2 Космосин , 1 мг/кг	Опыт 3 Лютеолин , 1 мг/кг	Опыт 4 Цинарозид , 1 мг/кг	Опыт 5 Густой экстракт тысячелистника, 1 мг/кг
24,86±2,1 1	11,29±4,98 *	15,00±3,70 *	27,57±3,0 8	6,43±3,34*	5,14±1,34*
100%	45%	60%	111%	26%	12%
О/К	p=0,028	p=0,039	p=0,481	p=0,001	p=0,001

6.3. Изучение антимикробной активности извлечений из травы *Achillea millefolium*

Оценка эффективности микробиологического анализа проводилась спустя 48-72 часа после инкубации при T=37°C, также проводилась визуальная оценка задержки роста. Из лунок с видимой задержкой роста проводили высев на питательные среды (5% кровяной агар-агар). Через 24 ч проводили оценку: отсутствие роста – бактерицидный эффект, появление видимого роста – бактериостатический.

Результаты оценки антимикробной активности выявили, что 40% водно-спиртовое извлечение оказывает антимикробное действие в отношении всех указанных штаммов при 1-кратном разведении. Наибольшей антимикробный действие отмечен для *Burkholderia cenocepacia* при разведении 1/128 (табл. 31).

Таблица 31 – Антимикробная активность водно-спиртового извлечения из травы тысячелистника обыкновенного (40%)

Штамм микроорганизма	№ разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Burkholderia cenocepacia</i> (штамм 105)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

<i>Burkholderia cenocepacia</i> (штамм 136)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia multivorans</i> (штамм 141)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia multivorans</i> (штамм 139)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (штамм 799)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

70% водно-спиртовое извлечение также оказывает антимикробное действие в отношении всех указанных штаммов при однократном разведении. При дальнейшем разведении сохранялась активность в отношении *Burkholderia cenocepacia* (штамм 105) (до разведения в 64 раза). Далее наблюдался рост всех тестируемых микроорганизмов (табл. 32).

Таблица 32 – Антимикробная активность спиртового извлечения из травы тысячелистника обыкновенного (70%)

Штамм микроорганизма	№ разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Burkholderia cenocepacia</i> (штамм 105)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia cenocepacia</i> (штамм 136)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia multivorans</i> (штамм 141)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia multivorans</i> (штамм 139)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (штамм 799)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

Спиртовое извлечение также проявляло антибактериальную активность в отношении всех указанных штаммов при однократном разведении. При дальнейшем разведении наблюдалось наибольшее проявление антимикробной активности в отношении *Burkholderia cenocepacia* обоих штаммов и *Burkholderia multivorans* (штамм 139) – при разведении в 16 раз (табл. 33).

Таблица 33 – Антимикробная активность спиртового извлечения из травы тысячелистника обыкновенного (96%)

Штамм микроорганизма	№ разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Burkholderia cenocepacia</i> (штамм 105)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia cenocepacia</i> (штамм 136)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia multivorans</i> (штамм 141)	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia multivorans</i> (штамм 139)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (штамм 799)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Эфирное масло травы тысячелистника обыкновенного также оказывает антимикробное действие в отношении всех указанных штаммов при однократном разведении. Наибольшее антимикробное действие выявлено в отношении *Burkholderia cenocepacia* (штамм 105) – при разведении в 128 раз (табл. 34).

Таблица 34 – Антимикробная активность спиртового извлечения из травы тысячелистника обыкновенного (96%)

Штамм микроорганизма	№ разведения											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>Burkholderia cenocepacia</i> (штамм 105)	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia cenocepacia</i> (штамм 136)	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia multivorans</i> (штамм 141)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Burkholderia multivorans</i> (штамм 139)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (штамм 799)	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-

Таким образом, нами было проведено скрининговое исследование антибактериальной активности извлечений из травы *Achillea millefolium* L. Эфирное масло из травы *Achillea milefollium* L. и 40% водно-спиртовое излечение при воздействии на *Burkholderia cenocepacia* (штамм 105) при разведении 1/128 имеют наиболее выраженный антимикробный эффект. На наш взгляд, это связано с веществами нелетучей природы – флавоноидами гликозидной природы и фенилпропаноидами, которые описаны для данного растения. Анализ выявил, что у остальных образцов анализа противомикробная активность невысока, при этом эфирное масло имеет схожий со спиртом эффект. В связи с этим образцы анализа возможно исследовать в дальнейшем при разработке ЛФ сочетанной терапии муковисцидоза.

6.4. Изучение острой токсичности густого экстракта травы тысячелистника обыкновенного.

Определение острой токсичности для экстракта густого травы *Achillea millefolium* анализировали с помощью методики, указанной ранее в Главе 2.

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

В связи с результатами исследования, можно сделать вывод, что препараты травы тысячелистника обыкновенного не содержат токсичных веществ и подходят для длительного применения в целях лечения и профилактики хронических заболеваний.

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 6

1. Проведены исследования фармакологической активности 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.

2. 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.

3. Эфирное масло из травы *Achillea millefolium* L. и 40% водно-спиртовое извлечение при воздействии на *Burkholderia cepacensis* (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.

4. 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'-тригидроксифлавонон) и цинарозид (7-О- β -D-глюкопиранозид лютеолина). Следует отметить, что апигенин (5,7,4'-тригидроксифлавонон) 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'-тетрагидроксифлавонон), 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 $\lambda_{\text{max}} = 400 \pm 2$ 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 *Achilléa* L. При ВЭЖХ-анализе видов рода *Achilléa* 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 milefolium* L. и 40% водно-спиртовое извлечение при воздействии на *Burkholderia cepocercacia* (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.

Практические рекомендации. Результаты диссертационной работы будут способствовать совершенствованию подходов в стандартизации ЛРС, содержащего флавоноиды, и могут быть использованы в учебно-образовательных процессах по дисциплинам «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия», а также в организациях и предприятиях, специализирующихся в области создания, стандартизации, сертификации и контроля качества ЛС и ЛП.

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

Список литературы

1. Асланова, Д. Тысячелистник обыкновенный в народной и научной фитотерапии / Д. Асланова, И.Д. Кароматов // Биология и интегративная медицина. – 2018. — Т. 1, № 18. — С. 167-186.
2. Бенетис, Р. Количественное определение фенольных соединений в лекарственном сырье тысячелистника обыкновенного методом ВЭЖХ / Р. Бенетис, И. Радушене, В. Якштас, В. Янулис, Г. Пуоджюнене, А. Милашюс // Химико-фармацевтический журнал. — 2008. — Т. 42, № 3. — С. 51-54.
3. Борский, М.Н. Изменчивость и таксономия видов рода *Achillea* L. (подрода *Achillea*) Европейской России [Текст]: дис. ... канд. биол. наук 03.02.01 / Борский Матвей Николаевич. – Москва, 2017. – 220 с.
4. Борский, М.Н. Морфологический полиморфизм *Achillea millefolium* S.L. в Самарской области / М.Н. Борский // Вестник Московского государственного областного университета. Серия: Естественные науки. — 2014. — № 1. — С. 29-42.
5. Бускунова, Г.Г. Экологические и биохимические особенности *Achillea nobilis* L. в условиях степной зоны Южного Урала [Текст]: дис. ... канд. биол. наук 03.00.16 / Бускунова Гульсина Гильмановна. – Уфа: 2009. – 175 с.
6. Быкова, Е.Е. Содержание и компонентный состав эфирного масла *Achillea millefolium* L. в условиях культуры / Е.Е. Быкова, В.В. Пунегов, В.П. Мишуров // Вестник Института биологии Коми научного центра Уральского отделения РАН. — 2009. — Т. 3, № 137. — С. 26-28.
7. Варданян, Л.Р. Антиоксидантная активность этилацетатного экстракта разных видов тысячелистника (*Achillea* L.) / Л.Р. Варданян, Л.В. Атабекян, С.А. Айрапетян, Р.Л. Варданян // Химия растительного сырья. — 2018. — № 3. — С. 61-68. — Режим доступа: <https://doi.org/10.14258/jcprm.2018033697>.
8. Верниковская, Н.А. Идентификация и хроматографическое определение фенольных соединений в тысячелистнике обыкновенном / Н.А. Верниковская, З.А. Темердашев // Аналитика и контроль. — 2012. — № 2. — С. 188-195.

9. Генатуллина, Г.Н. Оценка противомикобактериального и сенсибилизирующего действия биологически активных веществ экстрактов тысячелистника обыкновенного и тысячелистника мелкоцветкового / Г.Н. Генатуллина, О.В. Астафьева, З.В. Жаркова // Прикаспийский вестник медицины и фармации. — 2020. — Т. 1, № 2. — С. 26-31. DOI: 10.17021/2020.1.2.26.31

10. Глушко, М.П. Формакогностическое изучение травы тысячелистника широколопастного [Текст]: дис. ... канд. фарм. наук 15.00.02 / Глушко Маргарита Петровна. – Пятигорск, 2007. – 172 с.

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

12. Государственная фармакопея Республики Беларусь. В 3 т. Т. 2 Общие и частные фармакопейные статьи / УП «Центр экспертиз и испытаний в здравоохранении»; под общ. ред. А. А. Шерякова. – Минск: Минский государственный ПТК полиграфии им. В. Хоружей, 2009.

13. Государственная фармакопея Республики Казахстан. Т. 2. / Издательский дом «Жибек жолы» – Алматы, 2009.

14. Губанов, И.А. Дикорастущие полезные растения СССР [Текст]: справочное издание / И. А. Губанов; ред. Т. А. Работнов. – М. : Мысль, 1976. – 360 с.

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

16. Державна Фармакопея України: у 3 т. / Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр». — 1-е вид. — Доповнення 2 — Харків: Державне підприємство «Науково-експертний фармакопейний центр», 2008. — 620 с.

17. Дьякова, Н.А. Изучение минерального комплекса травы тысячелистника обыкновенного / Н.А. Дьякова // Альманах молодой науки. — 2022. — Т. 4, № 47. — С. 38-41.

18. Дьякова, Н.А. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин в траве тысячелистника обыкновенного / Н.А. Дьякова // Сборник материалов II Международной научной конференции "Роль метаболомики в совершенствовании биотехнологических средств производства" по направлению "Метаболомика и качество жизни". — 2019. — С. 500-506.

19. Евдокимова, О.В. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве тысячелистника. / О.В. Евдокимова // Вестник Воронежского государственного университета. серия: Химия. Биология. Фармация. — 2007. — №2. — С. 155-160.

20. Евдокимова, О.В. Разработка методологии стандартизации и контроля качества средств растительного происхождения: гармонизация, унификация, валидация [Текст]: дис. ... докт. фарм. наук 14.04.02 / Евдокимова Ольга Владимировна. — Москва, 2012. — 338 с.

21. Есикова, Е. Происхождение образа гомеровского Ахиллеса / Е. Есикова // *Magistra Vitae*: электронный журнал по историческим наукам и археологии. — 2002. — Т. 2, № 14. — С. 160-161.

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

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

24. Илиада / Гомер; пер. с др.-греч. Н.И. Гнедича. — СПб : Азбука, Азбука-Аттикус, 2018. — 608 с. — (Мировая классика).

25. И-Цзин. Китайская Книга Перемен. Древнейшее искусство предсказания будущего / Коллектив авторов — «Эксмо», 2012.

26. Ишакаева, М.К. Тест Порсолт (Porsolt) в современной физиологии и медицине / М.К. Ишакаева // Научное и образовательное пространство: перспективы развития: сб. науч. тр. – Чебоксары, 2018. – С. 10-11.
27. Калинкина, Г.И. Химический состав эфирных масел некоторых видов тысячелистника флоры Сибири / Г.И. Калинкина, А.Д. Дембицкий, Т.П. Березовская // Химия растительного сырья. — 2000. — №3. — С. 13-17.
28. Калошина, Н.А. Флавоноиды *Achillea millefolium* / Н.А. Калошина, И.Д. Нешта // Химия природных соединений. — 1973. — № 2. — С. 273.
29. Калошина, Н.А. Рутин из *Achillea millefolium* / Н.А. Калошина, И.Д. Нешта, Г.Г. Запесочная, А.И. Баньковский // Химия природных соединений. — 1972. — № 5. — С. 676-677.
30. Карчевская, К.И. Оптимизация экстракции флавоноидов тысячелистника травы [Электронный ресурс] / К.И. Карчевская, Р.И. Лукашов // Инновации в медицине и фармации - 2020: материалы дистанцион. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых, Минск, 12 октяб. 2020 г. / под ред. С. П. Рубниковича, В. Я. Хрыщановича. — Минск. — 2020. — С. 784-787.
31. Карчевская, К.И. Подбор методики экстракции флавоноидов тысячелистника травы / К.И. Карчевская, Р.И. Лукашов // Природные соединения и здоровье человека. Сборник научных статей Всероссийской научно-практической конференции. ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России. — 2021. — С. 86-88.
32. Керимли, Э.Г. Изучение компонентного состава и антимикробной активности эфирного масла тысячелистника благородного (*Achillea nobilis* L.) / Э.Г. Керимли, С.В. Серкерев // Вестник Фармации. — 2021. — Т. 1, № 91. DOI: 10.52540/2074-9457.2021.1.36
33. Керимли, Э.Г. Изучение состава эфирного масла *Achillea nobilis* L. и его антибактериальное влияние на изменение ультраструктуры клеток *Staphylococcus aureus* / Э.Г. Керимли, Э.К. Гасымов, С.В. Серкерев, Ю.Б. Керимов, Ф.Г. Рзаев, С.А. Мурадова, С.А. Исрафилова // Химия растительного сырья. — 2021. — № 1. — С. 93-104.

34. Киселева, К.В. Флора средней полосы России: Атлас-определитель / К.В. Киселева, С.Р. Майоров, В.С. Новиков. Под ред. проф. В.С. Новикова. – М.: ЗАО «Фитон+», 2010. – 544 с.
35. Киселева, Т.Л. Лекарственные растения в мировой медицинской практике: государственное регулирование номенклатуры и качества / Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова – М.: Проф. ассоц. Натуротерапевтов. – 2009. – 295 с.
36. Киселева, Т.Л. Отечественные фармакопейные растения и сырье / Т.Л. Киселева, Ю.А. Смирнова, А.А. Карпеев, И.А. Самылина, Е.В. Цветаева, Л.Н. Фролова, О.А. Корвякова // Учебное пособие. – М.: Издательство Профессиональной ассоциации натуротерапевтов, 2009. – 26 с.
37. Комаров, Б.А. Элементный состав тысячелистника обыкновенного / Б.А. Комаров // Разработка и регистрация лекарственных средств. — 2018. — № 3. — С. 158-161.
38. Куркин, В.А. Фармакогнозия: Учебник для фармацевтических вузов (факультетов) / В.А. Куркин. – 5-е изд., перераб. и доп. – Самара: ООО «Офорт»: ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России, 2020. – 1278 с.
39. Куркин, В.А. Основы фитотерапии: учебное пособие / В.А. Куркин. - Самара: ГОУ ВПО «СамГМУ Росздрава»; ООО ОФОРТ, 2009. - С. 462-463.
40. Куркина, А.В. Флавоноиды фармакопейных растений: монография / А.В. Куркина. – Самара: ООО «Офорт», ГБОУ ВПО СамГМУ Минздравсоцразвития России, 2012. – 290 с.
41. Маевский, П.Ф. Флора средней полосы европейской части России. / П.Ф. Маевский. - 11-е изд. - М.: Товарищество научных изданий КМК, 2014; С. 360-362.
42. Маланкина, Е.Л. Лекарственные растения в декоративном садоводстве: учебное пособие / Е.Л. Маланкина. – Москва: ИНФРА-М, 2023. – 240 с.
43. Мейер-Меликян, Н.Р. Атлас пыльцевых зерен Астровых (*Asteraceae*). Палиноморфология и развитие спородермы представителей семейства *Asteraceae* / Н.Р. Мейер-Меликян – Москва: Товарищество научных изданий КМК, 2004. – С. 173-174.

44. Мельникова, Д.Д. Исследование антимикробных свойств настоя травы тысячелистника / Д.Д. Мельникова, Е.А. Кузнецова // Сборник научных трудов по материалам VI Всероссийской научно-практической конференции «ГОРИЗОНТЫ БИОФАРМАЦЕВТИКИ». — 2020. — С. 25-26.

45. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Методические указания. МУК 4.2.1890-04 // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. — 2004. — Т.6, № 4. — С. 306-359.

46. Палей, Р.В. Химический состав эфирного масла *Achillea millefolium* L. и его модификация [Текст]: дис. ... канд. хим. наук 02.00.03 / Палей Руслан Владимирович. — Казань: 1998. — 173 с.

47. Панасенко, Н.И. Когнитивно-ономасиологическое исследование лексики: Опыт сопоставительного анализа названий лекарственных растений. [Текст]: дис. ... докт. филол. наук 10.02.19 / Н.И. Панасенко; Ин-т языкознания РАН. - Москва: 2000. — 397 с.

48. Пичугина, В.К., Визуальность и нарративность в античной традиции об Ахиллесе: уникальный проект аристократического образования / В.К. Пичугина, А.С. Жирнова // Отечественная и зарубежная педагогика. — 2021. — Т. 1, № 4. — С. 25-26. DOI: 10.24412/2224-0772-2021-77-30-44

49. Пичугина, В.К. Хирон как наставник в медицине Ахиллеса и Асклепия: педагогическая миссия городского кентавра / В.К. Пичугина // НУРОТНЕКАІ. — 2022. — №6. — С. 78-104.

50. Плантариум. Растения и лишайники России и сопредельных стран: открытый онлайн атлас и определитель растений. 2007—2023. [Электронный ресурс] URL: <https://www.plantarium.ru/> (дата обращения: 28.09.2023).

51. Платонов, В.В. Хромато-масс-спектрометрия толуольного экстракта тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L., семейство Астровые - *Asteraceae*) (сообщение II) [Электронный ресурс] / В.В. Платонов, Б.Г. Валентинов, Г.Т. Сухих, В.Е. Франкевич, В.А. Дунаев, М.В. Волочаева // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. — 2022. — № 16 (1). — С. 99-106.

URL: <http://www.medtsu.tula.ru/VNMT/Bulletin/E2022-1/3-2.pdf> (дата обращения: 28.01.2022). DOI: 10.24412/2075-4094-2022-1-3-2

52. Платонов, В.В. Хромато-масс-спектрометрия гексанового экстракта тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L., семейство Астровые - *Asteraceae*) (Сообщение I) / В.В. Платонов, В.А. Дунаев, Г.Т. Сухих, М.В. Волочаева, В.Е. Франкевич, Ф.С. Датиева // Вестник новых медицинских технологий. — 2020. — Т. 27, № 4. — С. 82–86. DOI: 10.24411/1609-2163-2020-16751.

53. Платонов, В.В. Хромато – масс – спектрометрия этанольного экстракта тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L., семейство Астровые - *Asteraceae*) (сообщение IV) / В.В. Платонов, Г.Т. Сухих, А.А. Хадарцев, В.А. Дунаев, М.В. Волочаева, В.Е. Франкевич, Ф.С. Датиева // Вестник новых медицинских технологий. — 2021. — Т. 28, № 1. — С. 30–34. DOI: 10.24412/1609-2163-2021-1-30-34.

54. Правила сборки и сушки лекарственных растений (сборник инструкций) / под ред. Ю.В. Махотина. – М.: Медицина, 1985. – С. 264-267.

55. Покровская, И.С. Хемотаксономия тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.) / И.С. Покровская, О.В. Мазова, Н.Н. Апыхтин, В.В. Племенков //Химия растительного сырья — 2009. — № 3. — С. 85–88.

56. Рябинина, Е.И. Фитохимическое исследование полифенольного комплекса из травы тысячелистника обыкновенного / Рябинина Е.И., Зотова Е.Е., Пономарева Н.И. // Наука и современность. — 2011. — № 9-2. — С. 65–69.

57. Самылина И.А., Аносова О.Г. Фармакогнозия. Атлас: учебное пособие: в 2-х томах. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. – Т.2 – С. 81-86.

58. Серегин А.П. (ред.) Цифровой гербарий МГУ: Электронный ресурс. – М.: МГУ, 2023. – Режим доступа: <https://plant.depo.msu.ru/>

59. Светличная Е.И. Этимологический словарь латинских ботанических названий лекарственных растений. Учебное пособие для студентов высших учебных заведений. / Е.И. Светличная, И.А. Толоч. – Харьков: Издательство НФаУ «Золотые страницы». – 2003. – С. 9.

60. Тарун, Е.И. Антиоксидантная активность экстрактов цветов и листьев тысячелистника / Е.И. Тарун, А.Н. Кухта, А.А. Небогаткина, В.П. Курченко // Журнал Белорусского государственного университета. Экология. — 2022. — № 3. — С. 57–65. DOI 10.46646/SAKH-2020-2-174-177
61. Терехов А.А. Определитель весенних и осенних растений среднего Поволжья и Заволжья [Текст] / А. А. Терехов; Средневолжский научно-исследовательский институт изучения и охраны природы. – 2-е изд. – Москва; Самара: Государственное издательство, Средневолжское краевое отделение, 1948. – 234 с.
62. Тимашева, Л.А. К методике определения хамазулена в сырье *Achillea millefolium* L. / Л.А. Тимашева, О.А. Пехова, И.Л. Данилова // Таврический вестник аграрной науки. – 2018. – Т. 3, № 15. – С. 119-125.
63. Флора СССР: в 30-ти томах / под ред. В.Л. Комарова. – Л.: Издательство Академии Наук СССР, 1937. – Т. 26. – С. 78-123.
64. Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. / Р.У. Хабриев – М.: ОАО «Издательство «Медицин», 2005. – 832 с.
65. Хадарцев, А.А. Хромато-масс-спектрометрия хлороформного экстракта тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L., семейство Астровые - *Asteraceae*) / А.А. Хадарцев, Г.Т. Сухих, В.В. Платонов, М.В. Волочаева, В.А. Дунаев, В.Е. Франкевич, Ф.С. Датиева // Клиническая медицина и фармакология. – 2020. – №3. – С. 47-52. DOI: 10.12737/2409-3750-2020-6-3-47-52
66. Чусовитина, К.А. Фармакологические особенности тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.) / К.А. Чусовитина, М.Ю. Карпухин // Аграрное образование и наука. – 2019. – №4. – С. 31.
67. Шаталина, Н.В. Содержание некоторых биологически активных веществ в траве тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium*), произрастающего в Красноярском крае / Шаталина Н.В., Первышина Г.Г., Ефремов А.А., Гордиенко Г.П., Агафонова Е.А., Гончаров Д.В. // Химия растительного сырья. – 2002. — №3. – С. 13-16.

68. Юсубов, М.С. Химический состав эфирного масла тысячелистников обыкновенного (*Achillea millefolium* L.) и азиатского (*Achillea asiatica* Serg.) // М.С. Юсубов, Г.И. Калинин, Л.А. Дрыгунова, Л.М. Покровский, Е.А. Королюк, А.В. Ткачев / Химия растительного сырья. – 2000. – №3. – С. 25-32

69. Юсупов, Р.М. Исследование антибактериального действия комбинации экстракта тысячелистника с антибиотиками в отношении стафилококка 209 P / Р.М. Юсупов, Н.А. Бабина // Студенческая наука и XXI век. — 2021. — Т. 18, № 1(21). — Ч. 1. — С. 66–68.

70. Alzomor, A.K.Y. Investigate the effects of *Achillea millefolium* plant extract as a hepatoprotection on carbon tetrachloride-induced liver toxicity in female rats / A.K.Y. Alzomor, N.H. Al-Absi, A.F. Al-hssany, H.S. Al-Salahi, A.A. Almushra'a // Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences. — 2022. — No. 8(5). — P. 227–233. DOI: 10.36348/sjimps.2022.v08i05.00X

71. Acimovic, M. The Quantitative Structure-Retention Relationship of the GC-MS profile of yarrow essential oil / M. Acimovic, L. Pezo, J. Jeremić, M. Todosijević, M. Rat, V. Tešević, M. Cvetkovic // Acta Periodica Technologica. — 2021. — No. 52. — P. 123–132. DOI: 10.2298/APT2152123A.

72. *Achillea millefolium*. Plants of the World Online by the Royal Botanic Gardens, Kew [Электронный ресурс]. Режим доступа: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:2294-2#source-KBD>

73. Ahmadi, A. Phytochemical, Antioxidant and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from Flowers and Leaves of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* / A. Ahmadi, H. Ezzatpanah, S. Asgary, S. Dokhani, E. Rahimi // Journal of Essential Oil Bearing Plants. — 2017. — No. 20. — P. 395-409. DOI: 10.1080/0972060X.2017.1280419

74. American Herbal Pharmacopoeia. Botanical Pharmacognosy – Microscopic Characterization of Botanical Medicines, 2011. URL: <https://archive.org/details/AmericanHerbalPharmacopoeiaBotanicalPharmacognosyMicroscopicCharacterizationOfBotanicalMedicines/page/n1/mode/2up>

75. Applequist, W.L. Yarrow (*Achillea millefolium* L.): A Neglected Panacea? A Review of Ethnobotany, Bioactivity, and Biomedical Research / W.L. Applequist, D. Moerman // *Economic Botany*. — 2011. — No. 65. — P. 209-225. DOI: 10.1007/s12231-011-9154-3.
76. Aykutlu, A. Effect of diurnal and morphogenetic variability on total phenol and antioxidant activity in *Achillea* (*Achillea millefolium* and *Achillea filipendulina*) / A. Aykutlu, E. Yurteri, F. Seyis, H. Küplemez // IV INTERNATIONAL İSTANBUL MODERN SCIENTIFIC RESEARCH CONGRESS. — 2022. — P. 459-466.
77. Azimova, Shakhnoza S. and Anna I. Glushenkova. “Lipids, Lipophilic Components and Essential Oils from Plant Sources.” *Lipids, Lipophilic Components and Essential Oils from Plant Sources* (2012): n. pag.
78. Barda, C. Phytochemistry and Evidence-Based Traditional Uses of the Genus *Achillea* L.: An Update (2011–2021) / C. Barda, M-E. Grafakou, E-M. Tomou, H. Skaltsa // *Scientia Pharmaceutica*. — 2021. — No. 89(4) — P. 50. DOI: 10.3390/scipharm89040050
79. Bashir, S. Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Biological Activities of *Achillea millefolium*: A Comprehensive Review / S. Bashir, A. Noor, M.I. Zargar, N.A. Siddiqui // *Edible Plants in Health and Diseases. Volume II: Phytochemical and Pharmacological Properties* (2022). DOI: 10.1007/978-981-16-4959-2_15.
80. Benedec, D. Comparative HPLC-MS analysis of phenolics from *Achillea distans* and *Achillea millefolium* and their bioactivity / D. Benedec, I.-E Popica, I. Oniga, D. Hanganu, M. Duma, R. Silaghi-Dumitrescu, C. Bischin Pușcaș, L. Vlase // *Studia Universitatis Babeș-Bolyai Chemia*. — 2015. — No. 60(4). — P. 257-266.
81. British Pharmacopoeia. Vol. IV. London: Medicines and Healthcare products Regulatory Agency; 2022. Yarrow; p. 532-533.
82. Chandler, R.F. Ethnobotany and phytochemistry of yarrow, *Achillea millefolium*, *Compositae* / R.F. Chandler, S.N. Hooper, M.J. Harvey // *Economic Botany*. — 1982 — Vol. 36, No. 2 — pp. 203–223. DOI 10.1007/BF02858720
83. Christodoulou, M. Herbal medicine in the fantastical myths of Ancient Greece. *The National Herald*. 2020. [Электронный ресурс] URL:

<https://www.thenationalherald.com/herbal-medicine-in-the-fantastical-myths-of-ancient-greece/>

84. Czech, K. Phytochemical Profiling, Antioxidant and Tyrosinase Regulatory Activities of Extracts from Herb, Leaf and In Vitro Culture of *Achillea millefolium* (Yarrow) / K. Czech, K. Gaweł-Bęben, A. Szopa, W. Kukula-Koch, T. Jakschitz, G. Bonn, S. Hussain, P. Kubica, H. Ekiert, K. Głowniak // *Molecules*. — 2023. — No.28. 4791. 10.3390/molecules28124791.

85. El-Kalamouni, C. Antioxidant and Antimicrobial Activities of the Essential Oil of *Achillea millefolium* L. Grown in France / C. El-Kalamouni, P.R. Venskutonis, B. Zebib, O. Merah, C. Raynaud, T. Talou // *Medicines*. — 2017. — No. 4(2) — P. 30. <https://doi.org/10.3390/medicines4020030>

86. European Pharmacopoeia — 11th edition published July 2022 URL: <http://pharneuropa.edqm.eu> (дата обращения: 25.09.2023).

87. Ghasemi, M. In vitro antibacterial activity and wound healing effects of *Achillea millefolium* essential oil in rat / M. Ghasemi, A. Ranjbar, P. Tamri, S. Pourmoslemi, A. Nourian, D. Dastan // *Journal of Pharmacopuncture*. — 2023. — No. 26. — P. 167-174. DOI: 10.3831/KPI.2023.26.2.167.

88. Ghavami, G. Anticancerous potentials of *Achillea* species against selected cell lines / G. Ghavami, S. Sardari, M. Shokrgozar // *Journal of Medicinal Plants Research*. — 2010. — No. 4. — P. 2411-2417.

89. Georgieva, L. *Achillea millefolium* L. – phytochemical profile and in vitro antioxidant activity / L. Georgieva, A. Gadjalova, D. Mihaylova, A. Pavlov // *International Food Research Journal*. — 2015. — No. 22. — P. 1347-1352.

90. Grigore, A. Antimicrobial Activity of an *Achillea millefolium* L. / A. Grigore, S. Colceru-Mihul, C. Bazdoaca, R. Yuksel, C. Ionita, L. Glava // *Proceedings*. — 2020. — No. 57 (1). — P. 34. DOI: 10.3390/proceedings2020057034.

91. Haziri, A.I. Secondary metabolites in essential oil of *Achillea millefolium* (L.) growing wild in east part of Kosova / A.I. Haziri, N. Aliaga, M. Ismaili, S. Govori-Odai, O. Leci, F. Faiku, V. Arapi, I. Haziri // *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. — 2010. — No. 6(1). — P. 32-34. DOI: 10.3844/ajbbsp.2010.32.34

92. Karaaslan Ayhan, N. Characterization of the antioxidant activity, total phenolic content, enzyme inhibition, and anticancer properties of *Achillea millefolium* L. (Yarrow) / N. Karaaslan Ayhan, M. Tunc, S. Noma, A. Kuruçay, B. Ates // Instrumentation Science & Technology. — 2022. — No. 50. — P. 1-14. DOI: 10.1080/10739149.2022.2073369.
93. Khanday, S. Phytochemical screening and physiochemical studies on aerial part of *Achillea millefolium* LINN. found in Kashmir / S. Khanday, M. Kalam, A. Ansari, A. Yousuf, S. Salim, R. Gani // Indian Journal of Unani Medicine. — 2022. — No. 14. — P. 76-82. DOI: 10.53390/ijum.v14.i2.3.
94. Kishkentayeva, A.S. Biologically active substances from *Achillea nobilis* L. / A.S. Kishkentayeva, S.N. Mantler, M.M. Zhakanov, S.M. Adekenov // Bulletin of the Karaganda University. Chemistry Series. — 2020. — No. 4 (100). — P. 52-59.
95. Krenn, L. Flavonoids from *Achillea nobilis* L. / L. Krenn, A. Miron, E. Pemp, U. Petr, B. Kopp // Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences. — 2003. — No. 58(1-2) — P. 11–16. DOI: 10.1515/znc-2003-1-202
96. Kumar, P. Pharmacognosy, phytochemistry, and molecular studies of an important medicinal herb *Achillea millefolium* L. / P. Kumar, R. Shruthi, I. Bindu, P. Raghavendra // Ayu. — 2021. — No.42(2) — P.93-102. DOI: 10.4103/ayu.ayu_401_21.
97. Lakshmi, T. Yarrow (*Achillea millefolium* Linn.) — A herbal medicinal plant with broad therapeutic use – A review / T. Lakshmi, R.V. Geetha, A. Roy, S. Kumar // International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research. — 2011. — No. 9. — P. 136-141.
98. Linne C. Species Plantarum: in 9 v. / C. Linne. – 1753. – 2 v. – P. 896-900.
99. Majid M. *Achillea millefolium* L a promising health aid in modern pharmacology / M. Majid, M. Roshan, L. Andleeb, M.I. Bhat // International Journal of Advanced Research in Science and Technology. — 2018. — No.7. — P.2167–2182.
100. Mockute, D. Variability of the essential oils composition of *Achillea millefolium* ssp. *millefolium* growing wild in Lithuania / D. Mockute, A. Judzentiene // Biochemical Systematics and Ecology. — 2003. — Vol. 31, No. 9. — P. 1033-1045. DOI: 10.1016/S0305-1978(03)00066-8.

101. Nematy, M. The effect of hydro-alcoholic extract of *Achillea millefolium* on appetite hormone in rats / M. Nematy, M. Mazidi, A. Jafari, S. Baghban, H. Rakhshandeh, A. Norouzy, H. Esmaily, L. Etemad, M. Patterson, A. Mohammadpour // *Avicenna journal of phytomedicine*. — 2017. — No. 7. — P. 10-15.

102. Radusiene, J. Trends in Phenolic Profiles of *Achillea millefolium* from Different Geographical Gradients // J. Radusiene, B. Karpaviciene, L. Raudone, G. Vilkickytė, C. Çırak, F. Seyis, F. Yayla, M. Marksa, L. Rimkienė, L. Ivanauskas / *Plants*. — 2023. — No. 12. — P. 746. DOI: 10.3390/plants12040746.

103. Saeidnia, S. A review on phytochemistry and medicinal properties of the genus *Achillea* / S. Saeidnia, A. Gohari, N. Mokhber-Dezfuli, F. Kiuchi // *Daru: journal of Faculty of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences*. — 2011. — No.19(3). — P. 173–186.

104. Salehi, B. *Achillea spp*: A comprehensive review on its ethnobotany, phytochemistry, phytopharmacology and industrial applications / B. Salehi, Z. Selamoglu, M. Sevindik, N.M. Fahmy, E. Al-Sayed, M. El-Shazly, B. Csupor-Löffler, D. Csupor, S.E. Yazdi, J. Sharifi-Rad, D.K. Arserim-Uçar, E.H. Arserim, N. Karazhan, A. Jahani, A. Dey, H. Azadi, S.A. Vakili, F. Sharopov, N. Martins, D. Büsselberg // *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*. — 2020. — No.66 (4). — P. 78–103.

105. Salomon, L. Comparison of the Phenolic Compound Profile and Antioxidant Potential of *Achillea atrata* L. and *Achillea millefolium* L. / L. Salomon, P. Lorenz, M. Bunse, O. Spring, F. Stintzing, D. Kammerer // *Molecules*. — 2021. — No. 26. — P. 1530. DOI: 10.3390/molecules26061530.

106. Smoilovska, H. Spectrophotometric study of tannins in the herb *Achillea millefolium* L. / H. Smoilovska, E. Maliugina, O. Yerenko, T. Khortetska // *Current issues in pharmacy and medicine: science and practice*. — 2023. — No. 16. — P. 130-134. DOI: 10.14739/2409-2932.2023.2.281344.

107. Stojanović, J. P. Essential Oils of Six *Achillea* Species: Chemical Profiles, Antimicrobial Potential and Toxicity toward Crustaceans / J.P. Stojanović, G.S. Stojanović, Z.Z. Stojanović-Radić, B.K. Zlatković, J.D. Ickovski, I.G. Zlatanović, S.Č.

Jovanović, Z.S. Mitić // Chemistry & biodiversity. — 2022. — No. 19(3). — e202100905. DOI: 10.1002/cbdv.202100905

108. Subramanian, G. Liquid chromatography-mass spectrometric method for simultaneous estimation of apigenin and luteolin from *Achillea millefolium* Linn. / G. Subramanian, Meyyanathan S.N, G. Byran, D. Palanisamy // Asian Journal of Research in Chemistry. — 2016. — No. 9. — P. 629. DOI: 10.5958/0974-4150.2016.00086.9.

109. Suleimen, Y. Essential oil composition of three species of *Achillea* from Kazakhstan / Y. Suleimen, G. Atazhanova, T. Ozek, B. Demirci, A. Kulyyasov, S. Adekenov, K. Husnu Can. Baser // Chemistry of Natural Compounds. — 2001. — No. 37. — P. 447-450. DOI: 10.1023/A:1014471326724.

110. Toplan, G.G. Comparative studies on essential oil and phenolic content with in vitro antioxidant, anticholinesterase, antimicrobial activities of *Achillea biebersteinii* Afan. and *A. millefolium* subsp. *millefolium* Afan. L. growing in Eastern Turkey / G.G. Toplan, T. Taşkın, G. İşcan, F. Göger, M. Kürkçüoğlu, A. Civaş, G. Ecevit-Genç, A. Mat, K.H.C. Başer // Molecules. — 2022. — No.27(6) — P. 1956. DOI: 10.3390/molecules27061956

111. Villalva, M. Antioxidant, anti-inflammatory, and antibacterial properties of an *Achillea millefolium* L. extract and its fractions obtained by supercritical anti-solvent fractionation against *Helicobacter pylori* / M. Villalva, J.M. Silvan, T. Alarcón-Cavero, D. Villanueva-Bermejo, L. Jaime, S. Santoyo, A.J. Martinez-Rodriguez // Antioxidants (Basel, Switzerland). — 2022. — No.11(10). — 1849. DOI: 10.3390/antiox11101849

112. Vitalini, S. Phenolic compounds from *Achillea millefolium* L. and their bioactivity / S. Vitalini, G. Beretta, M. Iriti, S. Orsenigo, N. Basilico, S. Dall'Acqua, M. Iorizzi, G. Fico // Acta Biochimica Polonica. — 2011. — No 58(2). — P. 203-209.

113. Yaseen, M. Phytochemical screening and antioxidant activity of extracts of the leaf and stem of *Achillea millefolium* / M. Yaseen, M. Ahmad, T.A. Wani, M. Ahmad, B. Gani, R. Qureshi // International Journal of Advanced Science and Research. — 2017. — No. 55. — P. 2455-4227.

ПРИЛОЖЕНИЯ

**Приложение 1. Патент на изобретение «СПОСОБ
КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В
ТРАВЕ ТЫСЯЧЕЛИСТНИКА ОБЫКНОВЕННОГО»**

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
№ 2806035

**СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ
СУММЫ ФЛАВОНОИДОВ В ТРАВЕ
ТЫСЯЧЕЛИСТНИКА ОБЫКНОВЕННОГО**

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

Авторы: *Васькова Анастасия Игоревна (RU), Куркин Владимир
Александрович (RU)*

Заявка № 2022131278

Приоритет изобретения **30 ноября 2022 г.**

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений
Российской Федерации **25 октября 2023 г.**

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает **30 ноября 2042 г.**

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*

ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 429b6a0fe3853164ba196f83b73b4aa7
Владелец **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 18.05.2025 по 02.08.2024

Ю.С. Зубов



Приложение 2. Акты внедрения результатов диссертационной работы.



«Утверждаю»
Начальник ГБУЗ
«Центр контроля качества
лекарственных средств
Самарской области»
О.В. ОСИПОВА
«11» сентября 2023 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Васьковой Анастасии Игоревны «Сравнительное фармакогностическое исследование некоторых видов рода Тысячелистник (*Achillea* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) в ГБУЗ «Центр контроля качества лекарственных средств Самарской области»

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

Таким образом, внедрение результатов диссертационного исследования Васьковой А.И. будет способствовать повышению объективности стандартизации растительного сырья травы тысячелистника обыкновенного, а также лекарственных растительных препаратов на основе данного вида сырья.

Члены комиссии:

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

 Л.Е. ЖНЯКИНА

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

 Н.А. ЧЕРНЯЕВА

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

 О.А. ШАРЫМОВА



«Утверждаю»

Генеральный директор

ЗАО «Самаралектравы»

Н.Д. ЛУЖНОВ

2022 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Васьковой Анастасии Игоревны «Сравнительное фармакогностическое исследование некоторых видов рода Тысячелистник (*Achillea* L.)» на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) в ЗАО «Самаралектравы»

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

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

Члены комиссии:

Заведующий производством ЗАО «Самаралектравы»  А.Н. ЗАГОРЯНСКИЙ

Главный инженер ЗАО «Самаралектравы»  А.В. НИКИТЕНКОВ

“Утверждаю”

Проректор по научной работе
ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России,
лауреат премии Правительства РФ,
доктор медицинских наук, профессор
И.Е. Давыдкин
“ 26 ” _____ 2023 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационного работы
Васьковой Анастасии Игоревны «Сравнительное фармакогностическое
исследование некоторых видов рода Тысячелистник (*Achillea* L.)» на соискание
ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2.
Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) в научно-
образовательном центре «Фармация» ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников научно-образовательного центра «Фармация» (НОЦ «Фармация»): директора, д.фарм.н. Рязановой Т.К., главного специалиста, к.фарм.н. Жданова Д.А., главного специалиста Соколовой И.В. подтверждает использование материалов диссертационного исследования Васьковой Анастасии Игоревны, посвященного определению диагностических признаков, изучению химического состава с использованием современных инструментальных методов анализа и обоснованию подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.), в научно-исследовательской работе по изучению лекарственного растительного сырья, содержащего флавоноиды.

Внедренные результаты способствуют повышению объективности стандартизации лекарственных препаратов на основе лекарственного растительного сырья тысячелистника обыкновенного.

Члены комиссии:

Директор НОЦ «Фармация»,
д. фарм. н.

Т.К. Рязанова

Главный специалист НОЦ «Фармация»,
к. фарм. н.

Д.А. Жданов

Главный специалист НОЦ «Фармация»

И.В. Соколова

“Утверждаю”

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

И.Г. Давыдкин

“ 26 ” _____ 2023 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы
Васьковой Анастасии Игоревны «Сравнительное фармакогностическое
исследование некоторых видов рода Тысячелистник (*Achillea* L.)» на соискание
ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2.
Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) на кафедре
фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ
Минздрава России

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

Члены комиссии:

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

В.А. Куркин

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

О.Е. Правдивцева

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

В.М. Рыжов

“Утверждаю”

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

И.Е. Давыдкин

“ 26 _____ 2023 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы
Васьковой Анастасии Игоревны «Сравнительное фармакогностическое исследование
некоторых видов рода Тысячелистник (*Achillea L.*)» на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия,
фармакогнозия (фармацевтические науки) на кафедре фармацевтической технологии с
курсом биотехнологий ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России

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

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

Члены комиссии:

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

 А.В. Куркина

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

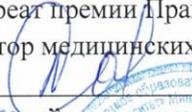
 С.В. Первушкин

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

 Л.Д. Климова

“Утверждаю”

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

 И.Л. Давыдкин

“ 26 ”  2023 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы
Васьковой Анастасии Игоревны «Сравнительное фармакогностическое
исследование некоторых видов рода Тысячелистник (*Achillea* L.)» на соискание
ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 3.4.2.
Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) на кафедре
управления и экономики фармации – базовая кафедра «Аптеки Плюс» ФГБОУ ВО
СамГМУ Минздрава России

Комиссия в составе сотрудников кафедры управления и экономики фармации – базовая кафедра «Аптеки Плюс»: зав. кафедрой, д.фарм.н., доцента Петрухиной И.К., профессора кафедры, д.фарм.н., доцента Гладуновой Е.П., доцента кафедры, к.фарм.н., доцента Абдулмановой Е.Л., подтверждает использование материалов исследования Васьковой А.И., посвященного изучению химического состава и разработке подходов к стандартизации лекарственного растительного сырья тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.) в учебном процессе при проведении практических занятий со студентами Института фармации, а также в научно-исследовательской работе.

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

Члены комиссии:

Зав. кафедрой управления и экономики фармации
– базовая кафедра «Аптеки Плюс»
д. фарм. н.

 И.К. Петрухина

Профессор кафедры управления и экономики фармации
– базовая кафедра «Аптеки Плюс»
д. фарм. н.

 Е.П. Гладунова

Доцент кафедре управления и экономики фармации
– базовая кафедра «Аптеки Плюс»
к. фарм. н.

 Е.Л. Абдулманова

Приложение 3. ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР - и масс-спектры индивидуальных соединений, выделенных из травы тысячелистника обыкновенного.

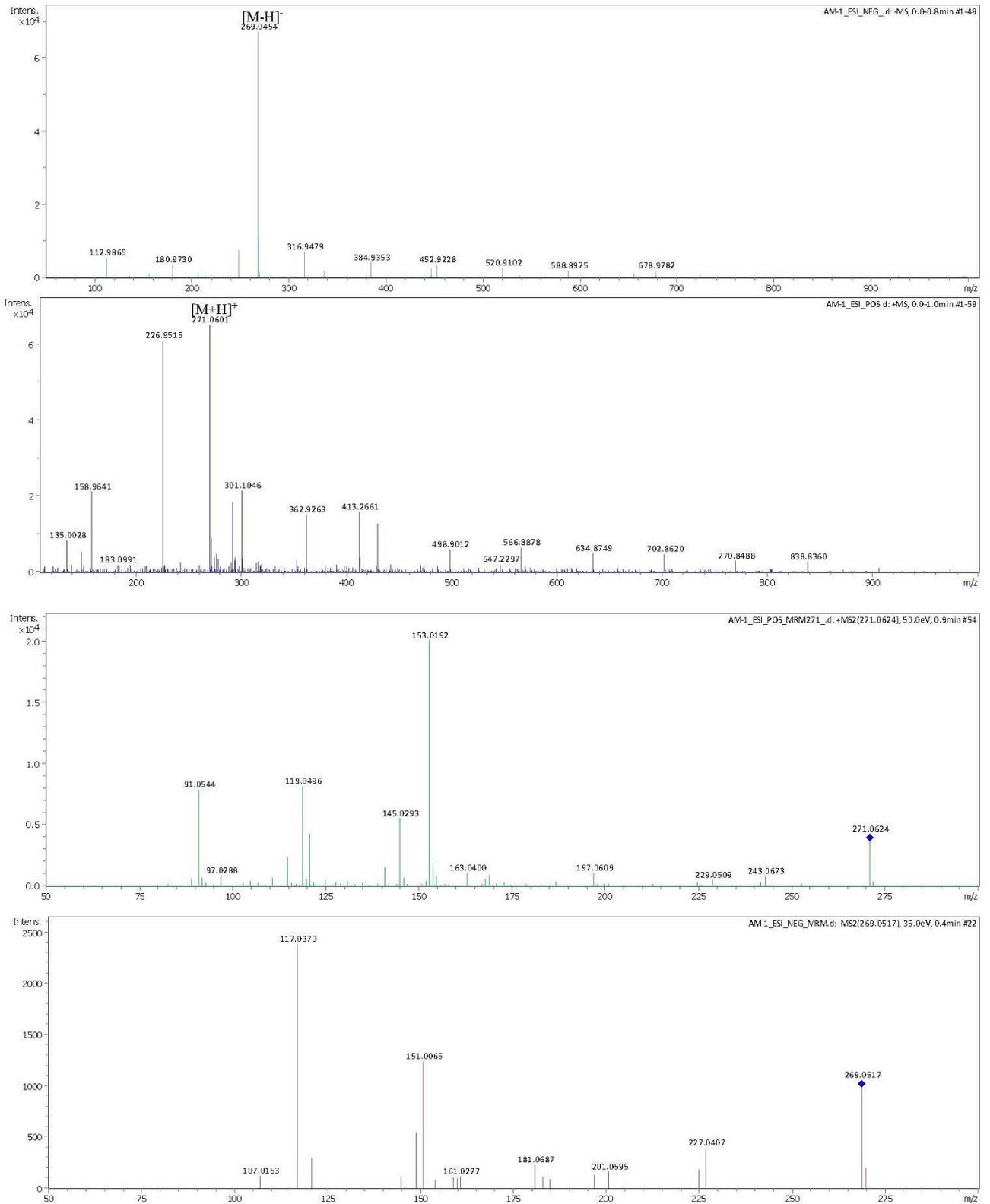


Рисунок 1 – Масс-спектр апигенина (5,7,4'-тригидроксифлавона)

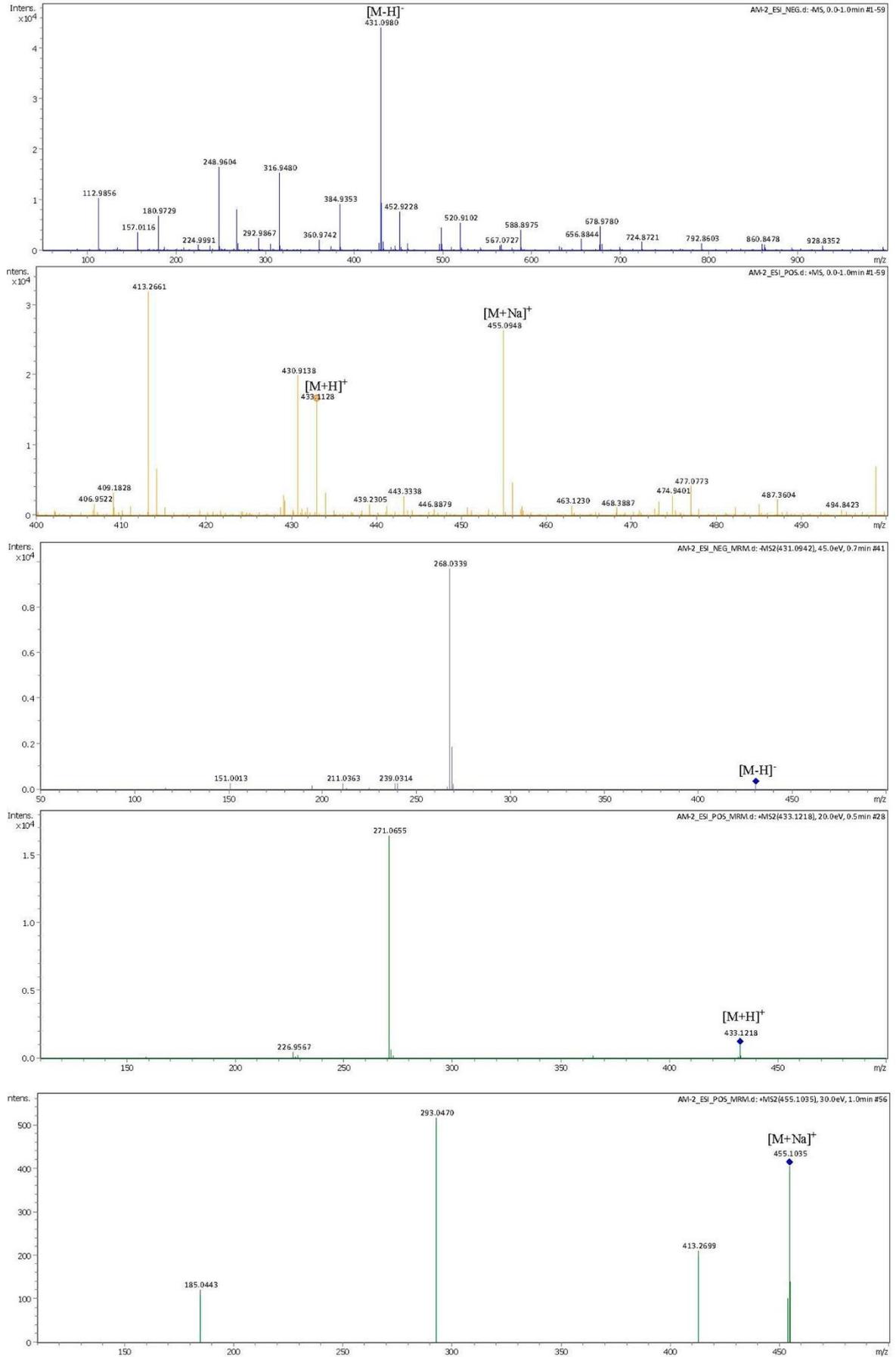


Рисунок 2 – Масс-спектр космосиина (7-О-β-О-глюкопиранозид апигенина)

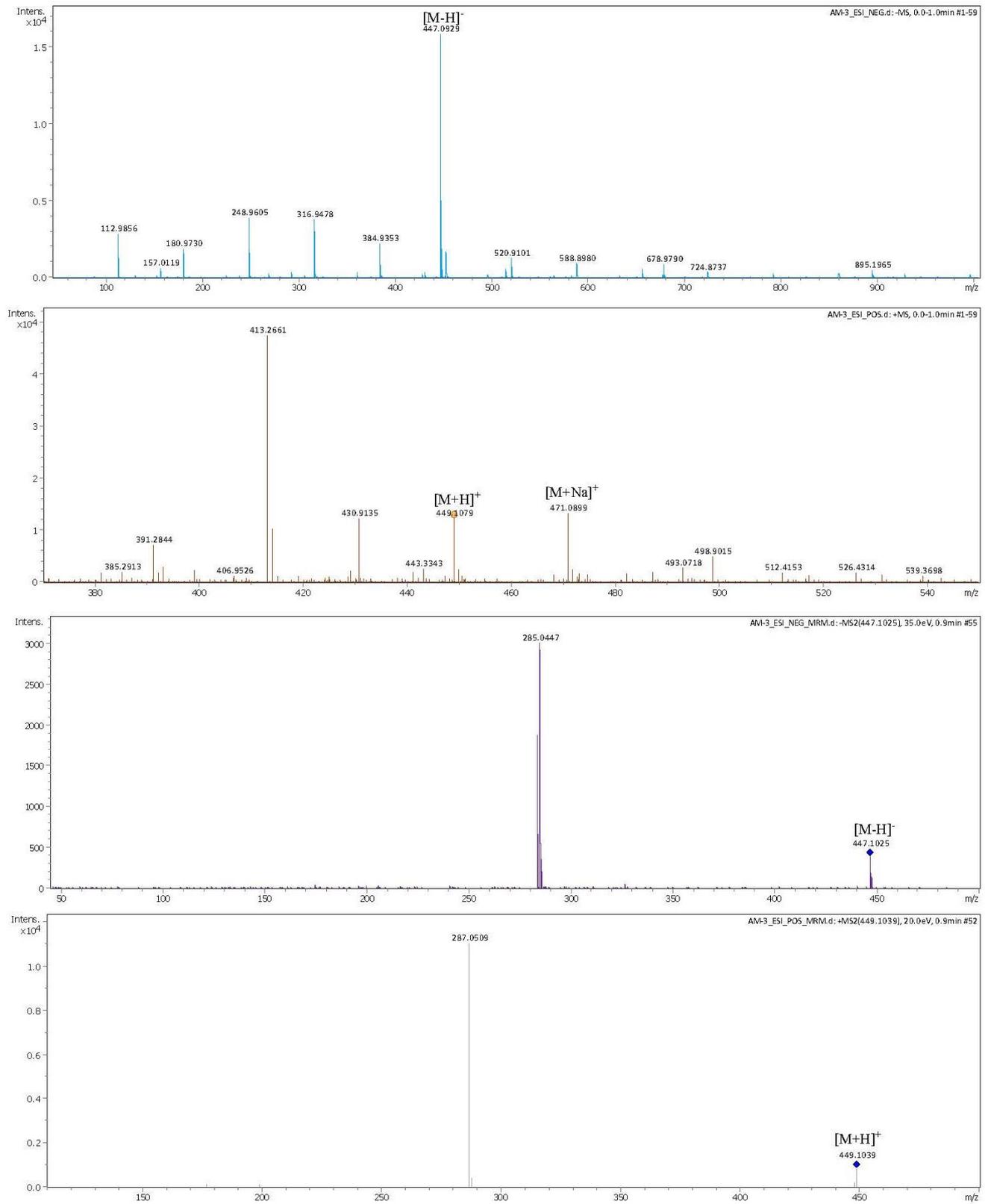
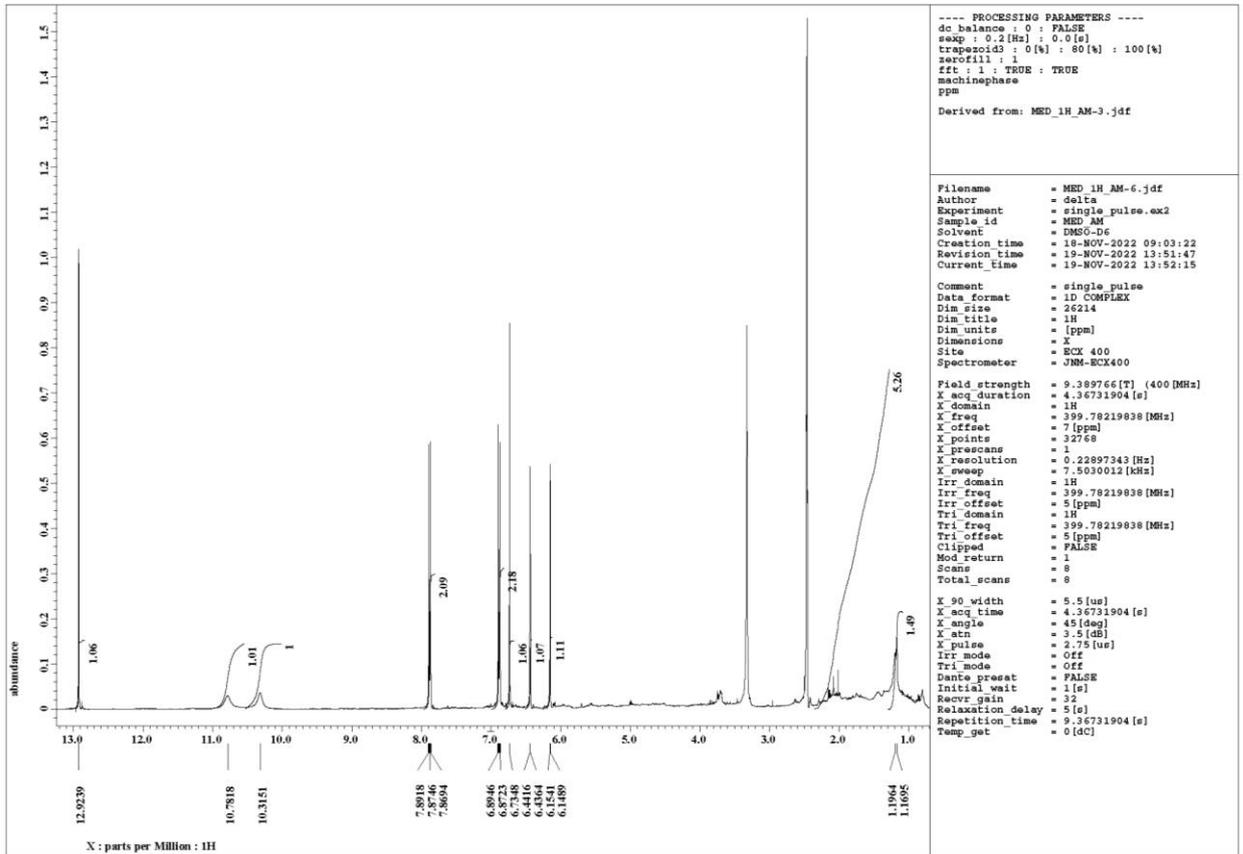
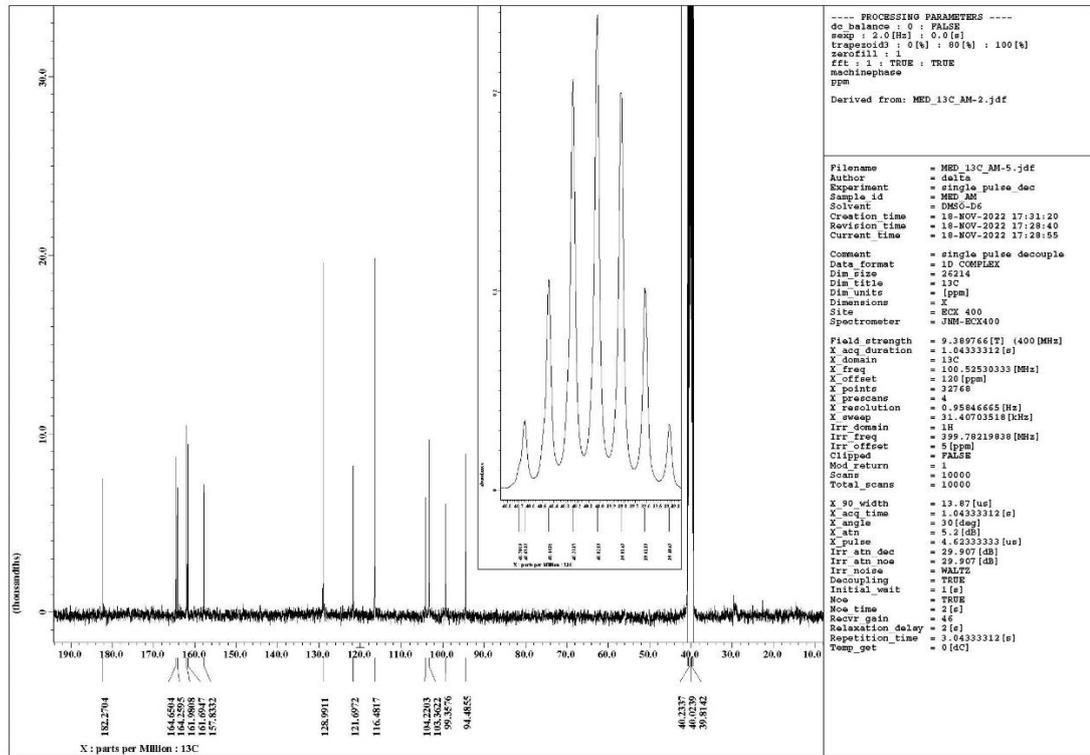
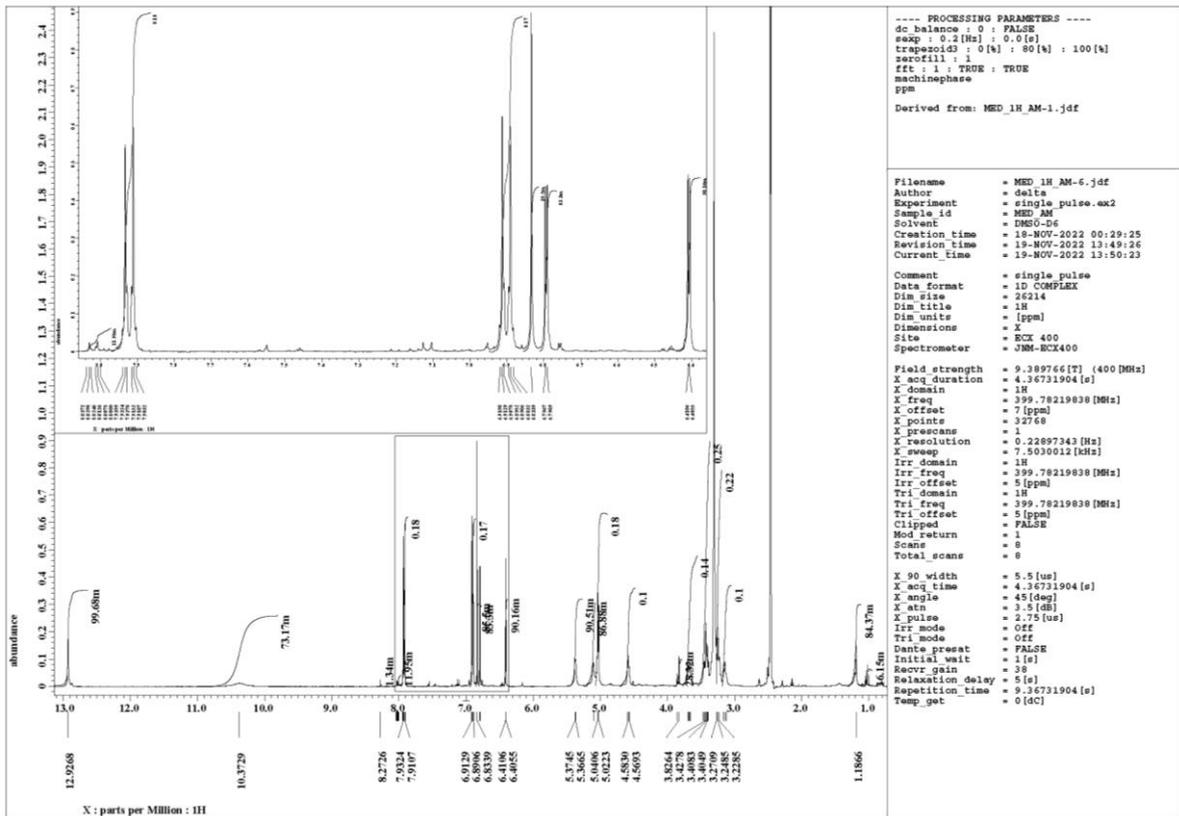
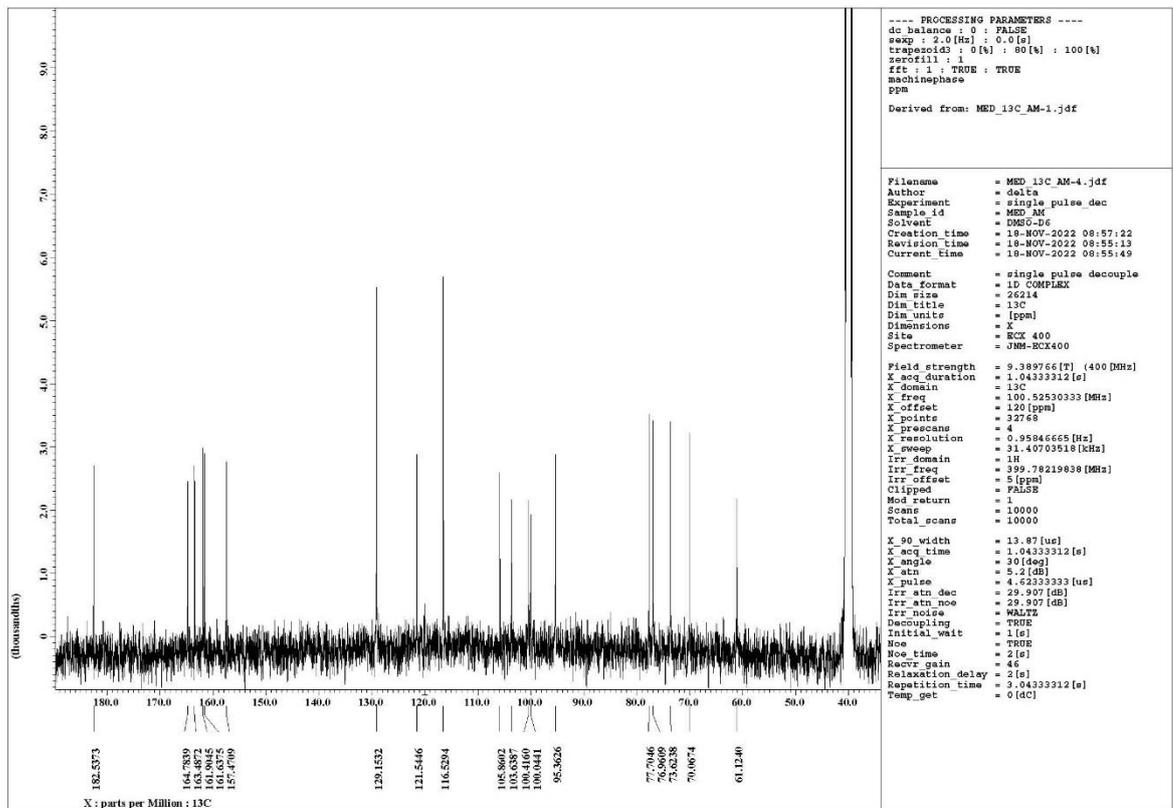
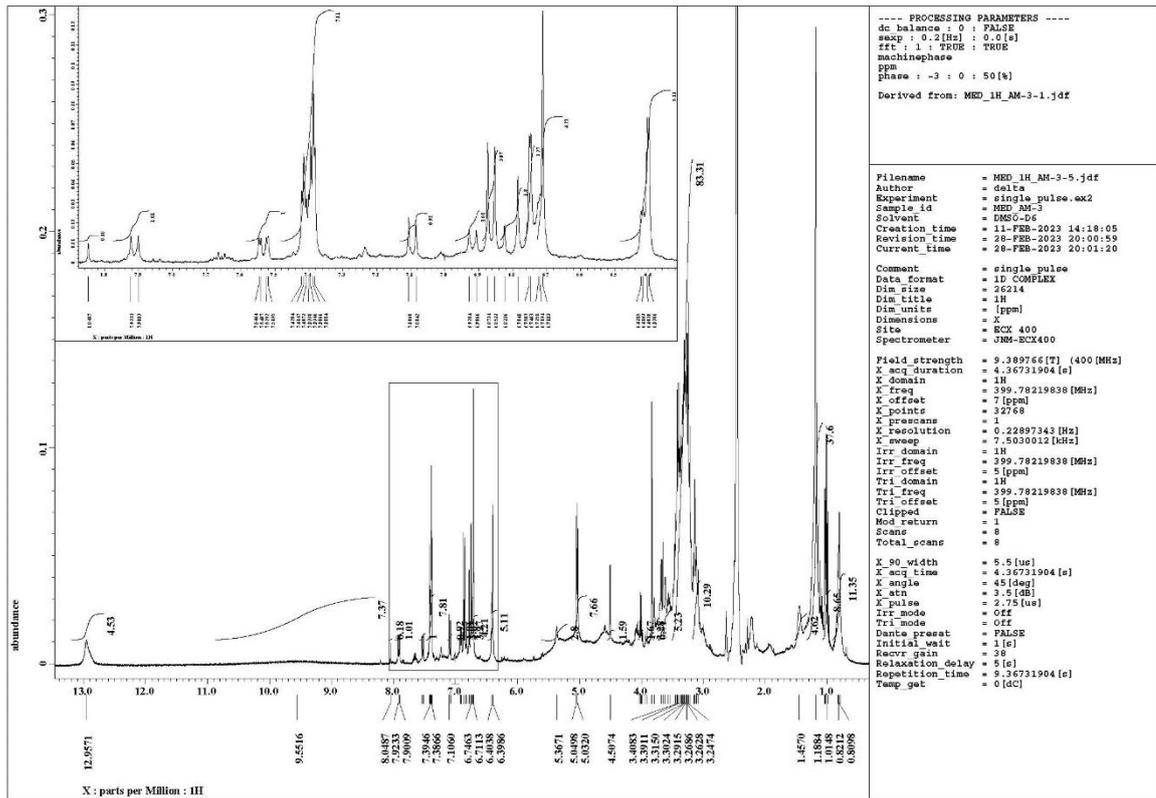
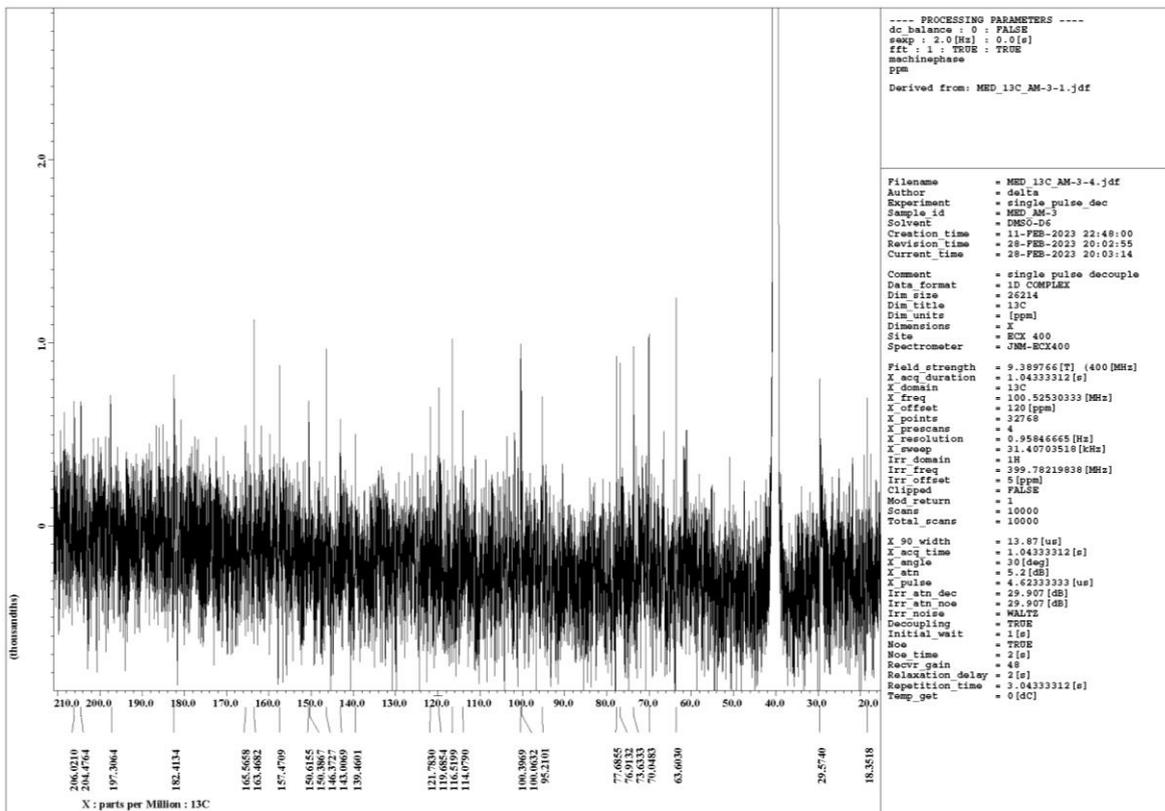


Рисунок 3 – Масс-спектр цинарозида (7-О-β-D-глюкопиранозид лутеолина)

Рисунок 4 – ^1H -ЯМР-спектр апигенина в DMSO-d_6 .Рисунок 5 – ^{13}C -ЯМР-спектр апигенина в DMSO-d_6 .

Рисунок 6 – ^1H -ЯМР-спектр космосина в ДМСО- d_6 .Рисунок 7 – ^{13}C -ЯМР-спектр космосина в ДМСО- d_6 .

Рисунок 8 – ^1H -ЯМР-спектр цинарозида в DMSO-d_6 .Рисунок 9 – ^{13}C -ЯМР-спектр цинарозида в DMSO-d_6 .

Приложение 4. Проект фармакопейной статьи на новый вид лекарственного растительного сырья «Тысячелистника обыкновенного трава».

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

УТВЕРЖДАЮ

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

Е.И. САКАНЯН

«__» _____ 20__ г.

**ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА
ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА**

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

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

Тысячелистника обыкновенного трава	ФС.2.5. Вместо ФС.2.5.0101.18
------------------------------------	----------------------------------

Achilleae millefolii herba

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

Собранная в фазу цветения, высушенная трава дикорастущего и культивируемого многолетнего травянистого растения тысячелистника обыкновенного – *Achillea millefolium* L., сем. астровые – *Asteraceae*.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ

ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА

Собранная в фазу цветения, высушенная трава дикорастущего и культивируемого многолетнего травянистого растения тысячелистника обыкновенного – *Achillea millefolium* L., сем. астровые – *Asteraceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

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

Цельное сырье. Цельные или частично измельченные цветоносные побеги. Стебли округлые, опушенные, с очередными листьями, длиной до 15 см. Листья длиной до 10 см, шириной до 3 см, продолговатые, дважды-перисторассеченные на ланцетные или линейные доли. На листе имеется концевой шипик клиновидной формы. Корзинки продолговато-яйцевидные, длиной 3-4 мм, шириной 1,5-3 мм, в щитковидных соцветиях или одиночные. Среднее количество цветков в элементарном соцветии корзинка должно составлять не менее 12 и не более 15. Обёртки соцветий состоят из черепитчатых продолговато-яйцевидных листочков с перепончатой коричневатой пигментацией. Цветоложе корзинок с пленчатыми прицветниками. Краевые цветки язычковые пестичные, срединные – трубчатые обоеполые.

Цвет стеблей и листьев серовато-зеленый, реже – красновато-зеленый; краевых цветков – белый, реже розовый, срединных – желтый или серовато-желтый; листочков обёртки – коричнево-зеленый. Запах слабый, ароматный. Вкус водного извлечения пряный, горьковатый.

Измельченное сырье. Кусочки листьев, стеблей, цветочных корзинок и отдельные цветки, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. При рассмотрении под лупой (10x) или стереомикроскопом (16x) должны быть видны серовато-зеленые кусочки листьев, рассеченных на узкие линейные доли; кусочки округлых стеблей серовато-зеленого или красновато-зеленого цвета; цельные продолговато-яйцевидные корзинки или их фрагменты; отдельные трубчатые и язычковые цветки и их фрагменты белого, бело-розового, желтого или

серовато-желтого цвета; кусочки листочков обертки корзинок зелено-коричневого цвета.

Цвет от серовато-зеленого до желтовато-зеленого с желтовато-белыми, светло-зелеными, белыми, красновато-зелеными и серовато-коричневыми вкраплениями. Запах слабый, ароматный. Вкус водного извлечения пряный, горьковатый.

Порошок. При рассмотрении порошка сырья под лупой (10х) или стереомикроскопом (16х) видна смесь частей листьев, стеблей, цветочных корзинок и отдельные цветки, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 1 мм. Цвет от серовато-зеленого до желтовато-зеленого с желтовато-белыми, светло-зелеными, белыми, красновато-зелеными и серовато-коричневыми вкраплениями. Запах слабый, ароматный. Вкус водного извлечения пряный, горьковатый.

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

Цельное, измельченное сырье.

При рассмотрении микропрепаратов листа должны быть видны фрагменты с эпидермисом из удлиненных клеток с извилистыми стенками и складчатой кутикулой, устьицами аномоцитного типа с 4-5 околоустьичными клетками и многочисленными простыми волосками, состоящими из 4-7 коротких тонкостенных клеток, лежащих в основании, и очень длинной конечной, слегка извилистой клетки с узкой нитевидной полостью, часто обломанной, эфирномасличные железки овальной формы с поперечной перегородкой, состоящие из 8 (6) выделительных клеток, расположенных в 2 ряда и 3-4 яруса, жилки сопровождаются секреторными ходами с желтовато-коричневым зернистым или маслянистым содержимым; конечный шипик листа клиновидной формы, средняя длина шипика $66,1 \pm 0,1$ мкм, средняя ширина шипика $52,8 \pm 0,2$ мкм; трубчатые и язычковые цветки или их фрагменты с эпидермисом из клеток с

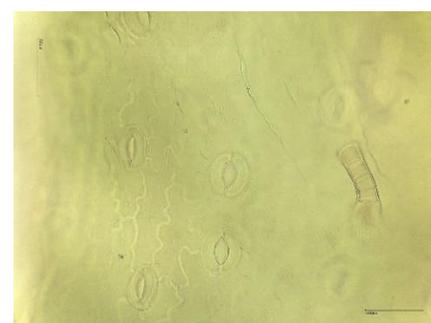
извилистыми стенками или сосочковидными выростами (бугорчатый эпидермис), эфирномасличными железками, волосками, мелкими друзами оксалата кальция; фрагменты листочков обертки, состоящие из узких удлиненных клеток с утолщенными пористыми стенками и секреторным ходом вдоль центральной жилки, средняя длина крупных листочков обертки составляет $5,5 \pm 0,1$ мм, средняя ширина крупных листочков обертки составляет $2,12 \pm 0,2$ мм, средняя длина малых листочков обертки составляет $3,4 \pm 0,2$ мм, средняя ширина малых листочков обертки составляет $2,14 \pm 0,2$ мм, средняя доля пигментации периметра листочков – не менее $20,0 \pm 0,1\%$, но не более $26,7 \pm 0,1\%$; фрагменты стебля с теми же диагностическими признаками, что и у листьев (тип устьичного препарата, волоски, железки); шиповатые пыльцевые зерна, средний диаметр пыльцевого зерна $25,0 \pm 2,2$ мкм, среднее количество шипов на поверхности – 21.



А – Определение количества цветков в элементарном соцветии корзинка (увеличение $\times 10$)



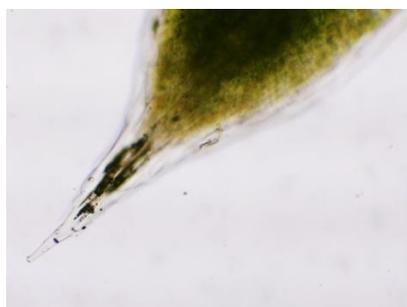
Б – Листочек обертки (увеличение $\times 10$)



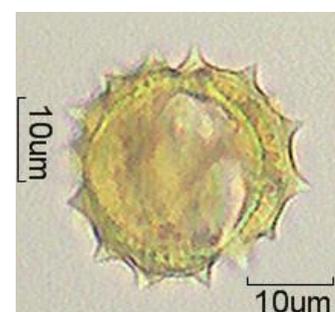
В – Фрагмент эпидермиса с аномоцитным устьичным аппаратом (увеличение на $\times 400$)



Г – Фрагмент эпидермиса с простыми волосками и эфиромасличными железками (увеличение $\times 100$)



Д – Конечный шипик листа клиновидной формы (увеличение $\times 100$)



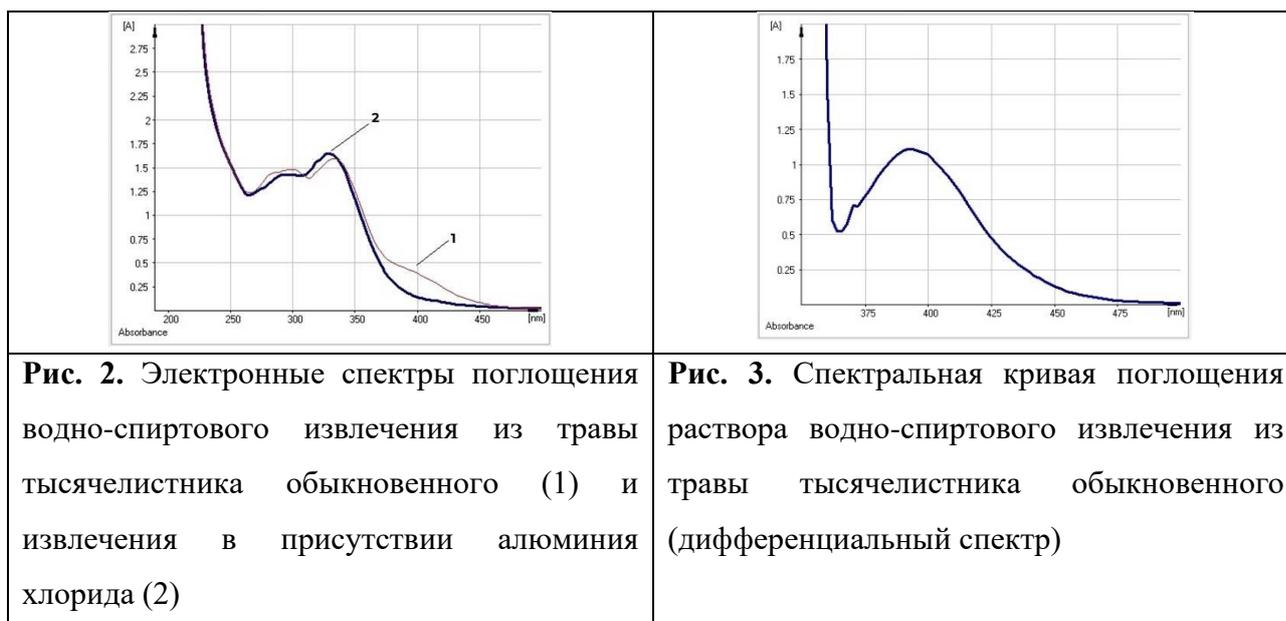
Е – Пыльца (увеличение $\times 400$)

Рис. 1. Микроскопические признаки травы тысячелистника обыкновенного

Определение основных групп биологически активных веществ:

1. УФ-спектроскопия

Испытуемый раствор, приготовленный как указано в разделе «Количественное определение» имеет максимум для дифференциальной кривой поглощения при длине волны 400 ± 2 нм (рис. 2, 3).



2. Тонкослойная хроматография

На линию старта аналитической хроматографической пластики со слоем силикагеля наносят 20 мкл испытуемого раствора извлечения и параллельно 5 мкл растворов образцов сравнения космосиина, апигенина, лютеолина и цинарозиды. Пластинку с нанесенными пробами сушат при комнатной температуре в течение 5 минут, помещают в камеру, предварительно насыщенную не менее 60 минут смесью растворителей хлороформ – этиловый спирт 96% – вода (25:18:2) и хроматографируют восходящим способом. Когда фронт растворителя пройдет около 80-90 % длины пластинки от линии старта, ее вынимают из камеры, сушат до удаления следов растворителя, обрабатывают 3% спиртовым раствором алюминия хлорида, сушат в сушильном шкафу при температуре 100-105 °С в течение 3-5 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 366 нм.

На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться: зона адсорбции с желтой флуоресценцией со значением R_f около 0,6 на уровне

адсорбции СО космосиина, зона адсорбции с лимонно-желтой флуоресценцией со значением R_f около 0,8 на уровне адсорбции СО апигенина, зона адсорбции с желтой или желто-зеленой флуоресценцией со значением R_f около 0,7 на уровне адсорбции СО цинарозида.

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

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

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

3. Высокоэффективная жидкостная хроматография

Времена удерживания основных пиков на хроматограмме испытуемого раствора должны соответствовать временам удерживания основных пиков на хроматограммах раствора СО космосиина, раствора СО цинарозида, раствора СО апигенина и раствора СО лютеолина.

ИСПЫТАНИЯ

Влажность. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 13%.

Зола общая. *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 15%.

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

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

Посторонние примеси.

Стебли толще 3 мм. Цельное сырье – не более 3 %.

Сырье, изменившее окраску (темно-коричневое и почерневшее). Цельное сырье, измельченное сырье – не более 1 %.

Органическая примесь. Цельное сырье, измельченное сырье – не более 1,5 %.

Минеральная примесь. Цельное сырье, измельченное сырье – не более 1 %.

Тяжелые металлы и мышьяк. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Радионуклиды. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Остаточные количества пестицидов. В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания остаточных пестицидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

Микробиологическая чистота. В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

Количественное определение. *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид – не менее 0,4 %; *Цельное сырье, измельченное сырье, порошок:* суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид – не менее 0,5 %; *цельное сырье:* эфирного масла – не менее 0,1 %, *измельченное сырье:* эфирного масла – не менее 0,08 %.

Сумма флавоноидов.**1. Определение суммы флавоноидов в пересчете на цинарозид**

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 стандартного образца цинарозида, г;

30 – объём извлечения, мл;

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

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

100 – содержание основного вещества в стандартном образце цинарозида, %;

25 – объём стандартного образца цинарозида, мл;

25 – объём колбы для приготовления раствора A стандартного образца цинарозида, мл;

2 – объём аликвоты извлечения для приготовления раствора A 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;

m_0 – масса СО цинарозида, г;

30 – объём извлечения, мл;

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

m – масса сырья, г;

340 – удельный показатель поглощения ($E_{1\text{см}}^{1\%}$) стандартного образца цинарозида при 400 нм;

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

W – потеря в массе при высушивании, %.

2. *Определение суммы флавоноидов в пересчете на космосин*

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, %.

Эфирное масло

В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания эфирного масла в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах» (метод 3, из 20,0 г сырья, измельченного до величины частиц,

проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, прибавляют 400 мл воды, время перегонки 2 ч).

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

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

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



И.Л. Давыдкин

«27» 12 2023

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

В.А. Куркин

«27» 12 2023

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

А.И. Васькова

«27» 12 2023