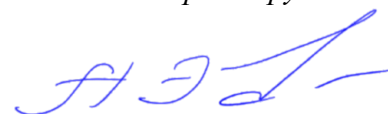


На правах рукописи



Айрапетян Эмма Эдуардовна

**Фармакогностическое изучение полыни метельчатой
(*Artemisia scoparia Waldst. et Kit.*)**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Москва – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор

Коновалов Дмитрий Алексеевич

Официальные оппоненты:

Кудашкина Наталья Владимировна – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии и ботаники, заведующий кафедрой

Жилкина Вера Юрьевна – кандидат фармацевтических наук, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», Институт фармации и биотехнологии, кафедра фармации и биотехнологии, доцент кафедры

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «21» мая 2025 г. в 12.00 часов на заседании диссертационного совета ДСУ 208.002.02 при ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, ул. Трубецкая, д. 8, стр. 2

С диссертацией можно ознакомиться в Фундаментальной учебной библиотеке ФГАОУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, г. Москва, Зубовский бульвар, д.37/1 и на сайте организации: <https://www.sechenov.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2025 года

Ученый секретарь

диссертационного совета ДСУ 208.002.02

доктор фармацевтических наук, профессор

Демина Наталья Борисовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В рамках программы Национальной технологической инициативы России по направлению ХелсНет, определяющей развитие лекарственного растениеводства до 2035 года, создание новых лекарственных средств природного происхождения является решением проблемы «поддержания здоровья пожилых людей на уровне, обеспечивающим активное долголетие». Всё большую ценность представляют «естественные биорегуляторы – традиционные растительные лекарственные средства с исторически доказанной эффективностью и безопасностью». Важной задачей, стоящей на уровне государства, является «создание научно-образовательных агротехнопарков и развитие отрасли лекарственного растениеводства». Для возрождения отрасли необходима «разработка новых биорегуляторов, выведение их на уровень, соответствующий мировым стандартам». Перспективными источниками биологически активных веществ для разработки подобных биорегуляторов являются виды рода Полынь (*Artemisia*). Виды этого рода применяются как в народной, так и в официальной медицине многих стран как желчегонные, отхаркивающие, жаропонижающие, бактерицидные, противогрибковые средства. Особое внимание привлекает полынь метельчатая (*Artemisia scoparia* Waldst. et Kit., *Asteraceae*). Трава полыни метельчатой входит в фармакопеи Китая, Тайваня и Германии, широко применяется в качестве желчегонного, гепатопротекторного, антигипертензивного, антимикробного, противовоспалительного, жаропонижающего средства для лечения гепатита, гипертонии, респираторных заболеваний, хронического цервицита.

Степень разработанности темы исследования

Исследования по изучению дикорастущей полыни метельчатой проводились отечественными и зарубежными учёными. Был изучен химический состав надземной части и эфирного масла. Доказано наличие полиацетиленовых соединений, веществ фенольной природы. Надземная часть этого вида использовалась для разработки лекарственных средств не только в Китае, но и в СССР. Максудовым Н.Х. был разработан препарат «Артемизол», составной частью которого являлось эфирное масло полыни метельчатой. Препарат применялся в урологической практике для лечения мочекаменной болезни. В СССР также на основе эфирного масла полыни метельчатой был разработан противогрибковый препарат «Оласкар». Несмотря на то, что были попытки введения данного растения в научную медицину, основные задачи для достижения этой цели не были решены. Тем не менее, в последние годы был опубликован целый ряд экспериментальных исследований и обзоров, посвящённых полыни

метельчатой, что подтверждает актуальность данной темы и существенные перспективы для её последующей разработки.

Цель и задачи исследования

Целью работы является фармакогностическое исследование надземной части полыни метельчатой и обоснование возможности использования её в качестве источника потенциального сырья для разработки лекарственных средств.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Провести поиск и анализ доступных научных литературных источников, характеризующих состояние изученности полыни метельчатой, химического состава её надземной части, фармакологической активности извлечений и индивидуальных БАВ, возможных методов стандартизации её сырья.
2. Провести фитохимический анализ (определить качественный состав и количественное содержание основных групп БАВ в исследуемом сырье).
3. Выполнить морфолого-анатомическое изучение надземной части полыни метельчатой с установлением анатомо-диагностических признаков.
4. Разработать показатели и нормы качества на Полыни метельчатой траву.
5. Разработать методики качественной идентификации и количественного определения основных групп биологически активных соединений и валидировать их.

Научная новизна

Впервые проведено комплексное фармакогностическое изучение сырья Полыни метельчатой травы сорта «Таврида», культивируемого на территории коллекционного питомника Никитского ботанического сада, с использованием химических, хроматографических и физико-химических методов анализа. В надземной части полыни метельчатой определены качественно и количественно методами ТСХ, ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС флавоноиды (лютеолин 6,8-ди-С-глюкозид; рутин; гиперозид; кемпферол-О-рутинозид и лютеолин), фенольные кислоты (хлорогеновая кислота, 3,5-, 3,4- и 4,5-дикофеилхинные кислоты) и кумарины (скополетин, скопарон и умбеллиферон). Разработаны методики качественной идентификации и количественного определения содержания основных групп биологически активных соединений (полиацетиленов, флавоноидов, кумаринов), проведена их валидация. Установлены показатели и нормы качества на Полыни метельчатой траву и эфирное масло полыни метельчатой.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость заключается в существенном расширении сведений о комплексе БАВ в траве полыни метельчатой и факторах, влияющих на их накопление. Это имеет важное значение в поиске «естественных биорегуляторов» для лечения и «поддержания здоровья пожилых людей на уровне, обеспечивающем активное долголетие», дальнейшей перспективы разработки на основе Полыни метельчатой травы и её эфирного масла новых лекарственных средств. Практическая значимость заключается в том, что разработанные методики позволяют стандартизовать Полыни метельчатой траву и её эфирное масло по основным группам действующих веществ. Экспериментально определены сроки заготовки сырья и получения эфирного масла, предложены показатели установления их подлинности и оценки качества. Предварительные фармакологические данные показывают целесообразность дальнейшего изучения эфирного масла и других суммарных комплексов на основе Полыни метельчатой травы в качестве перспективных фармацевтических субстанций для создания новых отечественных лекарственных препаратов.

Методология и методы исследования

Методология изучения полыни метельчатой травы и её эфирного масла основывается на результатах анализа научной литературы по теме исследования. Идентификацию и количественное определение биологически активных веществ проводили с использованием химических, хроматографических и физико-химических методов анализа (ВЭЖХ, ТСХ, хромато-масс-спектрометрия, УФ-спектрометрия, ЯМР- и масс-спектроскопия). Фармакологический скрининг осуществляли с использованием стандартных методик.

Положения, выносимые на защиту

1. Результаты фитохимического изучения основных групп БАВ полыни метельчатой;
2. Результаты морфолого-анатомического исследования надземной части полыни метельчатой;
3. Методики анализа, показатели и нормы качества на Полыни метельчатой траву и эфирное масло полыни метельчатой.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют п. 2, 3, 6 паспорта научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Степень достоверности и апробация результатов

Степень достоверности полученных данных определяется значительным объемом экспериментальных исследований, проведенных с использованием современных химических, физико-химических и морфолого-анатомических методов исследования. Результаты научно-исследовательской работы были представлены и обсуждены на конференциях: III Всероссийской конференции «Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез» (21 мая-27 мая 2017 год, Краснодар), XXV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (9-12 апреля 2018 года, Москва), Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной фармакогнозии» (19 марта 2021 года, Пятигорск), IV международном симпозиуме «Инженерные науки и науки о Земле: прикладные и фундаментальные исследования» (20 марта 2021 года, г. Грозный), Международной научно-практической конференции «Ароматные и лекарственные растения: интродукция, селекция, агротехника, биологически активные вещества, влияние на человека» (21-25 июня 2021 год, Ялта), Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной фармакогнозии» (18-19 марта 2022 года, Пятигорск), Международной научно-практической конференции «Экологические и фармакогностические вопросы выращивания лекарственных растений» (19-20 декабря 2022 года, Пятигорск), Международной научно-практической конференции «Во имя жизни и здоровья» (30-31 марта 2023 года, Пятигорск), Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной фармакогнозии» (27 марта 2023 года, Пятигорск), Международной научно-практической конференции «Беликовские чтения» (14-15 декабря 2023 года, Пятигорск), Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы современной фармакогнозии» (28-29 марта 2024 года, Пятигорск), Международной научно-практической конференции «Беликовские чтения» (11-13 декабря 2024 года, Пятигорск). Апробация работы состоялась на заседании кафедры фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолГМУ Минздрава России (протокол № 5 от 26.09.2023 г.).

Личный вклад автора

При непосредственном участии диссертанта были определены цели и задачи работы. Автор самостоятельно проводил поиск научных литературных источников по теме диссертации, самостоятельно выполнял экспериментальные исследования по фитохимическому, морфолого-анатомическому изучению надземной части полыни метельчатой, разработке методик количественного определения фенольных соединений в траве

полыни метельчатой, капиллина в эфирном масле полыни метельчатой. Диссертант установил показатели и нормы качества на Полыни метельчатой траву и эфирное масло полыни метельчатой. Диссертация и автореферат написаны лично автором.

Внедрение результатов исследования

Результаты диссертационного исследования внедрены и используются в учебном процессе, в научно-исследовательской работе:

- методика «Количественное определение капиллина в эфирном масле полыни метельчатой» на кафедре фармацевтической химии Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (акт внедрения от 08.04.2021 г.);

- результаты изучения противовоспалительной активности стоматологического геля с экстрактом полыни метельчатой на кафедре терапевтической стоматологии и пропедевтики стоматологических заболеваний, Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (акт внедрения от 12.04.2021 г.);

- методика «Количественного определения скопарона в траве полыни метельчатой» на фармацевтическом факультете ФГБОУ ВО КГМУ Минздрава России;

- методика «Количественного определения скопарона, скополетина, умбеллиферона, хлорогеновой кислоты в траве полыни метельчатой» в ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России.

Связь исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Диссертационная работа выполнена согласно плану работы Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России и в соответствии с тематикой научно-исследовательской работы кафедры фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов по теме: «Ботаническое и фармакогностическое исследование дикорастущих и культивируемых растений с целью расширения сырьевой базы и внедрения в медицинскую практику».

Публикации по теме диссертации

По результатам исследования по теме диссертации автором опубликовано 13 печатных работ, в том числе 3 научные статьи в журналах, включенных в Перечень ВАК при Минобрнауки России, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук; 1 научная статья в журнале, индексируемом в международной базе Scopus; иных научных публикаций по результатам исследования – 9.

Структура и объём диссертации

Диссертационная работа изложена на 169 страницах компьютерного набора и состоит из введения, обзора литературы, главы «Объекты и методы исследований», двух глав экспериментальной части, заключения, списка литературы, приложений. Иллюстрирована 45 таблицами и 38 рисунками. Список литературы включает 159 источников, из них 123 на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Объектом исследования являлась полынь метельчатая сорта «Таврида», собранная в различные фазы роста и развития (ветвление, бутонизация, цветение, созревание семян) в период 2016-2020 гг. на территории коллекционного питомника Никитского ботанического сада – Национального научного центра РАН.

В качестве сырья использовали надземную часть растения, срезанную на высоте 20-30 см над поверхностью почвы.

Сбор образцов сырья, их сушку и хранение проводили в соответствии с требованиями ГФ РФ XIV издания ОФС.1.5.1.0002.15 «Травы Негбае» и ОФС.1.1.0011.15 «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов» ГФ РФ XIV издания.

БАВ надземной части полыни метельчатой изучали, используя качественные химические реакции, тонкослойную хроматографию, высокоэффективную жидкостную хроматографию с УФ- и масс-детекторами (ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС), УФ-спектрофотометрию.

Морфолого-анатомическое исследование проводили в соответствии с методиками ОФС.1.5.3.0003.15 ГФ РФ XIV издания. При микроскопическом изучении использовали образцы воздушно-сухой надземной части полыни метельчатой сорта «Таврида», собранные в фазу цветения.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучение биологически активных соединений надземной части полыни метельчатой сорта «Таврида»

Объектом исследования являлась полынь метельчатая сорта «Таврида», заготовленная в основные фазы роста и развития (ветвление, бутонизация, цветение, созревание семян) в период 2016-2020 гг. на территории НБС – ННЦ РАН. В качестве сырья использовали надземную часть

растения, срезанную на высоте 20-30 см над поверхностью почвы.

Обзор данных научной литературы и первичное фитохимическое изучение надземной части полыни метельчатой с помощью качественных реакций и тонкослойной хроматографии позволили предположить присутствие в исследуемых образцах надземной части фенольных соединений (включая кумарины, флавоноиды, фенольные кислоты, дубильные вещества), эфирного масла, полиацетиленовых соединений (капиллина, капиллена), аминокислот.

Качественный анализ компонентов спиртового извлечения из полыни метельчатой травы методами ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС с использованием стандартных образцов показал присутствие флавоноидов (лютеолин 6,8-ди-С-глюкозид; рутин; гиперозид; кемпферол-О-рутинозид, лютеолин), фенольных кислот (хлорогеновая, 3,5-, 3,4- и 4,5-дикофеилхинные кислоты) и кумаринов (скополетин, скопарон, умбеллиферон). Идентификацию компонентов водноспиртового (70%) извлечения проводили с использованием стандартных образцов, данных библиотеки масс-спектров NIST, открытых интернет-ресурсов и данных литературы. Результаты представлены в Таблице 1 и на Рисунке 1.

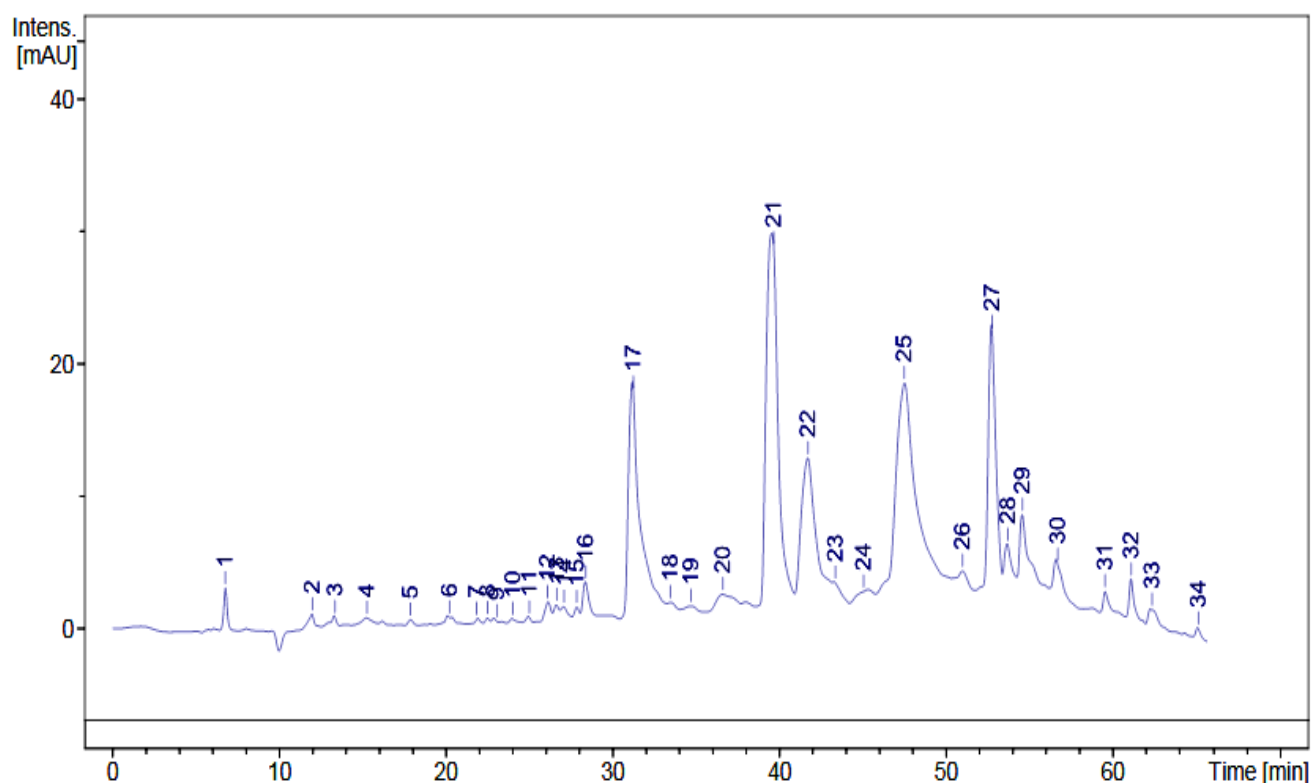


Рисунок 1 – Хроматографический профиль водноспиртового извлечения (70%) полыни метельчатой травы (УФ-детекция, 254 нм)

15 – лютеолин 6,8-ди-С-глюкозид; 16 – скополетин; 17 – хлорогеновая кислота; 21 – рутин; 22 – гиперозид; 23 – кемпферол-О-рутинозид; 24 – гесперидин; 25 – 3,5-дикофеилхинная кислота; 27 – 3,4-дикофеилхинная кислота; 29 – 4,5-дикофеилхинная кислота; 30 – лютеолин

Детекцию пиков осуществляли спектрофотометрически при 254 нм и с использованием масс-детектора Bruker Amazon SL (Bruker, США) в условиях ионизации электрораспылением (ESI).

Таблица 1 – Идентифицированные фенольные соединения спиртового извлечения полыни метельчатой травы

№ пика	Соединение	Время удерживания	m/z прекурсор	MS ² -фрагментация
1	Лютеолин 6,8-ди-С-глюкозид	27,83	609	489, 369
2	Скополетин	28,38	399	353, 191, 176
3	Хлорогеновая кислота	31,24	353	191,179
4	Рутин	39,66	609	301, 271, 255, 179, 343
5	Гиперозид	41,72	463	301, 179, 271, 151
6	Кемпферол-О-рутинозид	43,36	593	285
7	3,5-Дикофеилхинная кислота	47,50	515	353, 191, 173
8	3,4-Дикофеилхинная кислота	52,77	515	353, 203, 173, 299
9	4,5-Дикофеилхинная кислота	54,58	515	353, 255, 173, 203
10	Лютеолин	56,70	285	241, 257, 199

Количественное определение скопарона в траве полыни метельчатой методом тонкослойной хроматографии

Для количественного определения скопарона в извлечении полыни метельчатой использовали наиболее доступный метод тонкослойной хроматографии. Современные компьютерные технологии дают возможность проводить количественное определение веществ методом ТСХ с большой чувствительностью, эффективностью и с погрешностью, вполне допустимой для анализа растительных извлечений. Объектом исследования явилась полыни метельчатой трава сорта «Таврида», собранная в фазу начала цветения на территории коллекционного питомника Никитского ботанического сада в 2019-2020 гг. Извлечение из травы полыни метельчатой получали двухкратным настаиванием, при соотношении сырья и экстрагента 1:5 и 1:3. В качестве последнего использовали спирт этиловый 70%. На поверхности пластинки на треках стандартного образца скопарона (Sigma) и на треках с извлечением появлялись пятна ярко-синего свечения в УФ свете (254 нм) с R_f 0,57±0,02 (Рисунок 2).

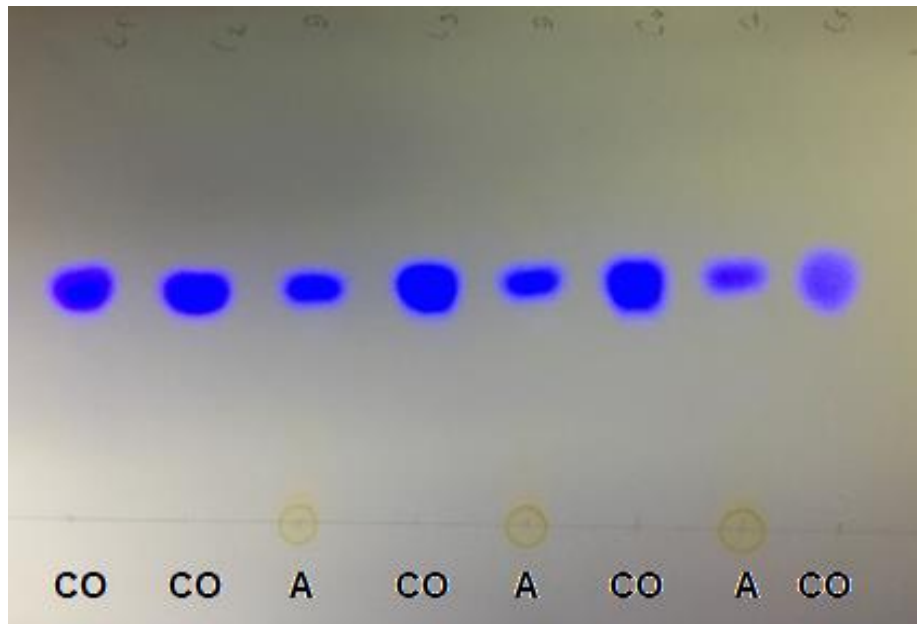


Рисунок 2 – Хроматографическая пластинка со стандартным образцом (СО) скопарона и водноспиртовым (70%) извлечением (А) полыни метельчатой (проявление в УФ свете, 254 нм) в различной концентрации

Пластинку фотографировали в УФ свете, фото обрабатывали с помощью компьютерной программы Денситометр Сорбфил и получали оцифрованную хроматограмму (Рисунок 3). На оцифрованной хроматограмме пик СО скопарона совпадал с пиком на треках извлечения.

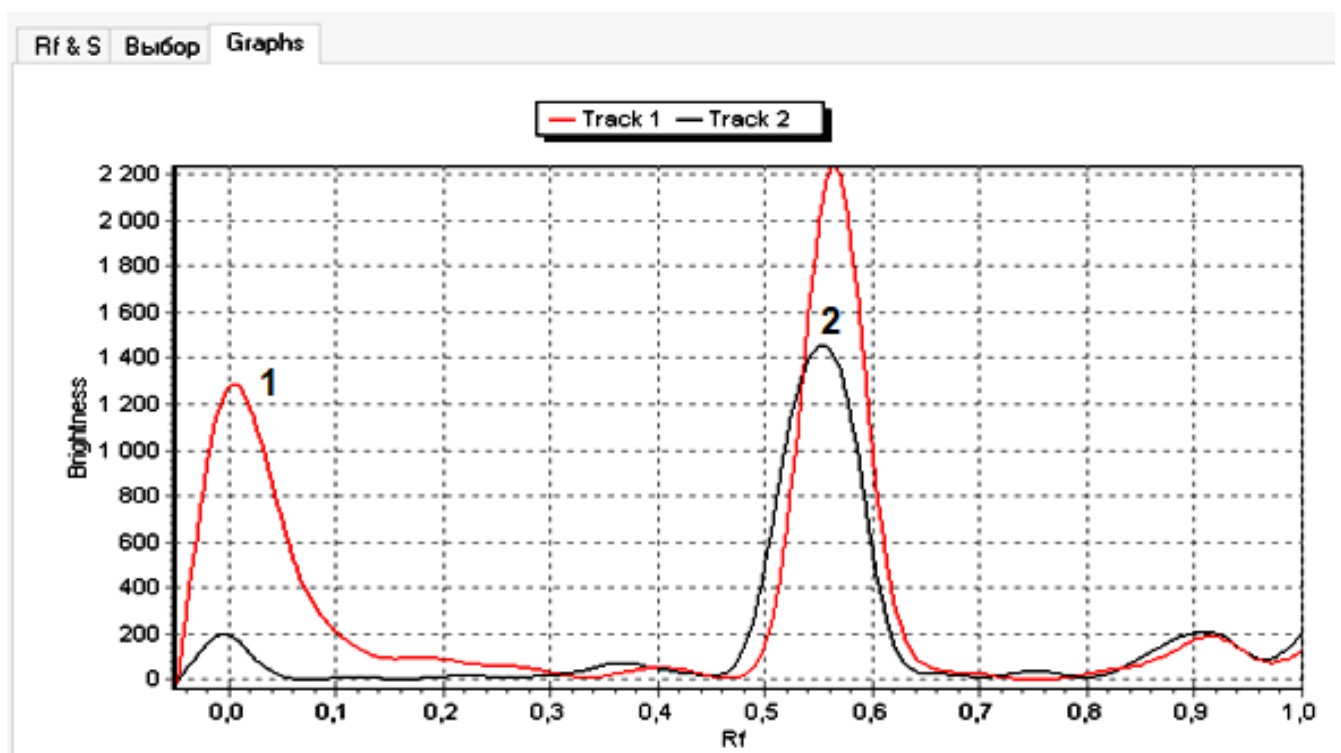


Рисунок 3 – Хроматограмма извлечения из полыни метельчатой (1) и СО скопарона (2)

Линейность. Для подтверждения линейности градуировочного графика результаты определения площадей зон сканирования СО скопарона обрабатывали методом наименьших квадратов, определяли значимость свободного члена, уравнение регрессии, коэффициент корреляции.

Результаты статистической обработки данных эксперимента подтверждают, что методика количественного определения скопарона в интервале массы от 1 до 5 мкг линейна. Свободный член не значим. Уравнение регрессии имеет вид: $S = 5,9 \times 10^4 m$ (Рисунок 4). Коэффициент корреляции $r = 0,995$.

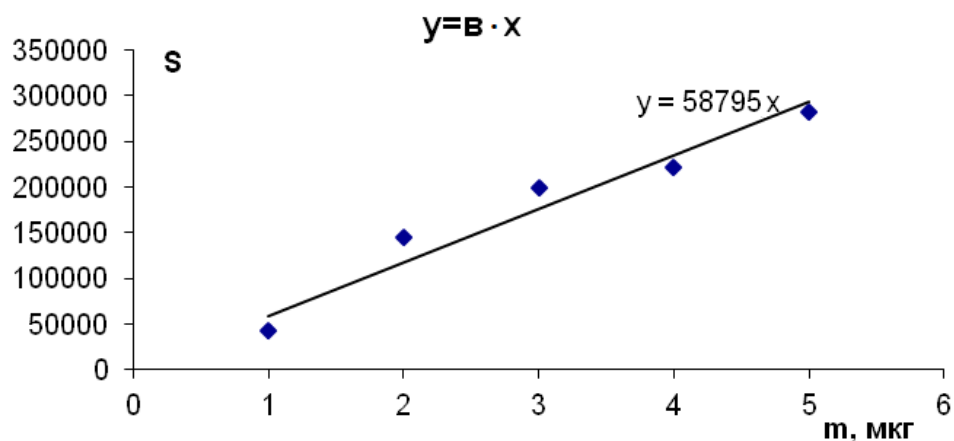


Рисунок 4 – Градуировочный график СО скопарона

Чувствительность. По данным градуировочного графика (Рисунок 4) определяли чувствительность метода: рассчитывали предел обнаружения (ПО) и предел количественного обнаружения (ПКО). Предел обнаружения рассчитывали по формуле: $ПО = 3,3 \times S/b$, где: S – стандартное отклонение сигнала; b – угловой коэффициент градуировочного графика. $ПО = 1,47$ мкг. Предел количественного определения (ПКО) рассчитывали по формуле: $ПКО = 10 \times S/b$, $ПКО = 4,46$ мкг.

Правильность методики определяли методом «введено-найдено» на пяти уровнях концентраций СО скопарона с двумя результатами на каждом уровне. Результаты следующие: $x_{ср.} = 97,3 \%$; $\Delta x = 7,9 \%$; $RSD\% = 11\%$; $E = 8,2\%$.

Внутрилабораторная прецизионность. Для получения статистически корректных данных количественного определения опыт проводили на нескольких пластинках с использованием не менее двух треков контрольного образца. Результаты обрабатывали методом математической статистики по Стьюденту. Результаты представлены в пересчёте на воздушно-сухое сырьё (Таблица 2).

Таблица 2 – Содержание скопарона в надземной части полыни метельчатой

Содержание скопарона, г/100 г сырья	Метрологические характеристики
0,31; 0,31; 0,33; 0,33; 0,35; 0,35; 0,37; 0,38; 0,40; 0,41.	$x_{\text{ср.}} = 0,35\%$ $\Delta x = 0,03\%$ $E = 7,14\%$

Таким образом, показана возможность количественного определения кумарина скопарона в водноспиртовом (70%) извлечении из надземной части полыни метельчатой сорта «Таврида» методом тонкослойной хроматографии с денситометрическим детектированием при использовании компьютерной программы Денситометр Сорбфил. Разработанная методика валидирована, чувствительная, высокоэффективна и не требует дорогостоящего оборудования. В условиях эксперимента определено, что среднее содержание скопарона в исследованных образцах травы полыни метельчатой сорта «Таврида», культивируемого на Южном берегу Крыма, составляет $0,35 \pm 0,03\%$.

Количественное определение кислоты хлорогеновой, скопарона, скополетина и умбеллиферона в извлечениях из надземной части полыни метельчатой методом высокоэффективной жидкостной хроматографии

Согласно монографиям на сырьё *Artemisiae scopariae herba* в Китайской фармакопее (2010 г.), Немецкой фармакопее и Фармакопее Тайваня (2016), при стандартизации этого вида растительного сырья в качестве маркерных веществ используются стандартные образцы кислоты хлорогеновой, скопарона, скополетина и умбеллиферона. При этом количественно определяется содержание кислоты хлорогеновой. Для качественной идентификации и количественного определения указанных кумаринов и кислоты хлорогеновой в образцах извлечений из надземной части полыни метельчатой, полученных с помощью спирта этилового 70%, был использован метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. Исследование проводили на жидкостном хроматографе Стайер компании «Аквилон» (Россия) с УФ-детектором (UVV 104M) в режиме ступенчатого градиента с использованием подвижной фазы следующего состава: ацетонитрил – муравьиной кислоты водный раствор 0,1%. Детектирование осуществляли при длине волны 280 нм. В качестве стандартных образцов использовали кислоту хлорогеновую, умбеллиферон и скополетин производства компании Sigma, с чистотой не менее 99,0%, а также скопарон компании Sigma с содержанием действующего вещества не менее 95,0%. Исследуемыми объектами являлись образцы водноспиртовых извлечений (70%) полыни метельчатой, полученные из надземной части полыни метельчатой сорта «Таврида», собранной в фазу начала цветения в Никитском ботаническом саду в 2017-2019 гг. Результаты

определения фенольных соединений в образцах извлечения полыни метельчатой методом ВЭЖХ представлены на Рисунке 5 и в Таблице 3.

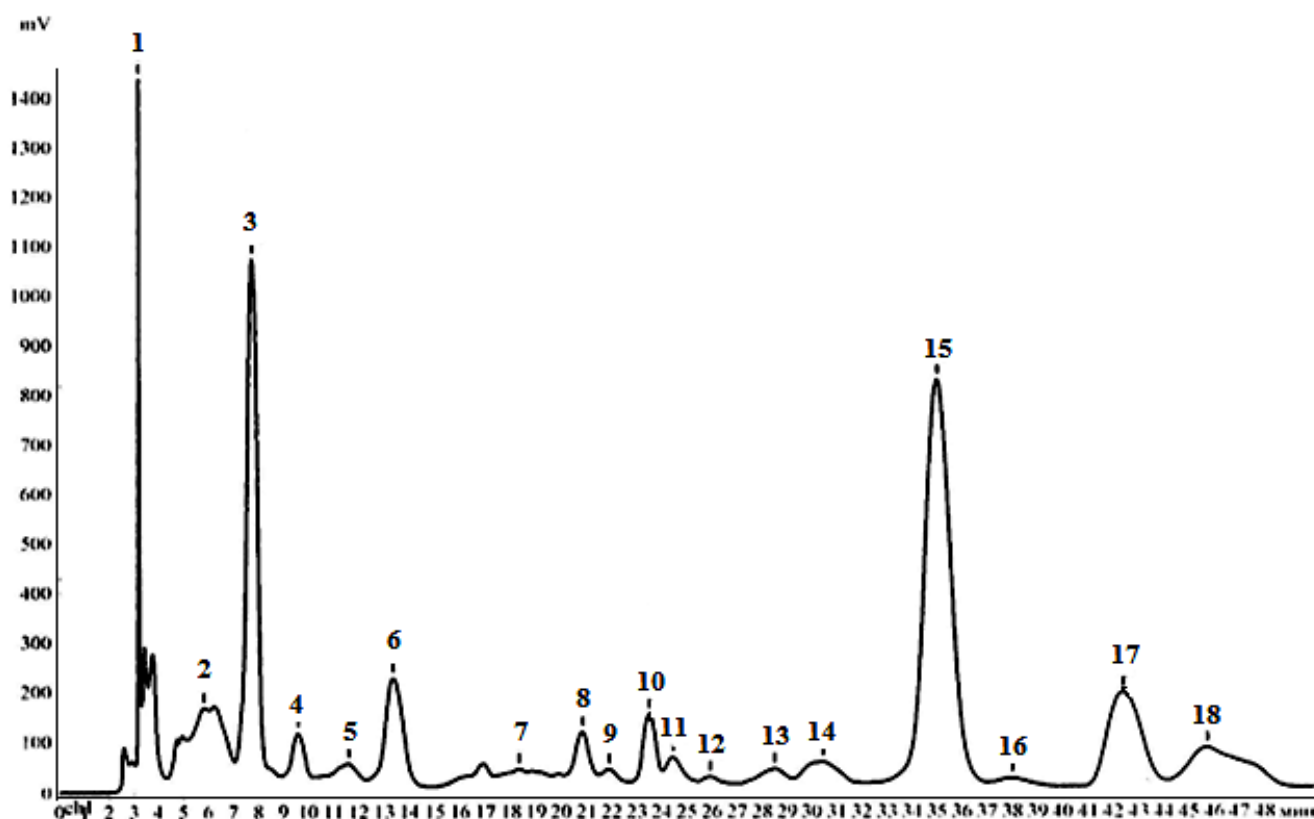


Рисунок 5 – Стандартная ВЭЖХ-хроматограмма водноспиртового извлечения из полыни метельчатой

3 – хлорогеновая кислота, 10 – скополетин, 11 – умбеллиферон, 17 – скопарон

Таблица 3 – Результаты количественного определения кислоты хлорогеновой, скополетина, умбеллиферона и скопарона в образцах водноспиртового извлечения (70%) полыни метельчатой

Год сбора надземной части	Определяемые вещества, % ($\bar{x} \pm \Delta x$)			
	Кислота хлорогеновая	Скополетин	Умбеллиферон	Скопарон
2017	0,1999±0,0064	0,0634±0,0034	0,0117±0,0009	0,1654±0,0048
2018	0,2161±0,0660	0,0741±0,0035	0,0117±0,0007	0,1823±0,0053
2019	0,1884±0,0056	0,0715±0,0038	0,0126±0,0010	0,1605±0,0050

Таким образом, методом ВЭЖХ с использованием стандартных образцов исследуемых веществ в образцах извлечений из надземной части полыни метельчатой, полученных из сырья 2017-2019 гг. сбора, были количественно определены 4 соединения фенольной природы: скопарон, скополетин, умбеллиферон и хлорогеновая кислота.

Количественное определение эфирного масла в надземной части полыни метельчатой

Эфирное масло из надземной части полыни метельчатой, заготовленной в фазу цветения, получали методом перегонки с водяным паром при использовании прибора Клевенджера в модификации Лошкарёва (метод 2, ГФ РФ XIV).

Предварительное изучение и подбор оптимальных условий перегонки показал, что при измельченности сырья 5-7 мм наибольший выход эфирного масла наблюдается через 5 часов. Выход эфирного масла в зависимости от образца составлял 0,82-1,15 об.% в пересчёте на воздушно-сухое сырьё. Более высокая степень измельчения, как и более длительный процесс отгонки не оказывали существенного влияния на увеличение объёма, выделяемого эфирного масла. Свежеполученное эфирное масло представляло собой легкоподвижную жидкость светло-жёлтого цвета с характерным запахом. Через несколько часов окраска масла становилась более интенсивной.

Изучение компонентного состава эфирного масла из надземной части полыни метельчатой

Согласно данным литературы, максимальная урожайность (до 121,4 ц/га) надземной массы полыни метельчатой сорта «Таврида» и сбор эфирного масла (до 82,5 кг/га) из неё приходится на фазу массового цветения. В период конца цветения эти показатели существенно снижаются, составляя 90,7 ц/га и 77,1 кг/га, соответственно. С точки зрения фармакологической активности, прежде всего, антибактериальных свойств, важным является содержание полиацетиленовых соединений (капиллена, капиллина и др.), с которыми эти свойства эфирного масла связывают. Поэтому нами были проведены исследования по идентификации и определению количественного содержания основных соединений в образцах эфирного масла из надземной части полыни метельчатой, собранной в период цветения (начало цветения, массовое цветение, конец цветения) на территории коллекционного питомника Никитского ботанического сада в 2018-2019 годах.

Исследование образцов эфирных масел полыни метельчатой, заготовленных в разные периоды фазы цветения показывает, что содержание основного полиацетиленового соединения – капиллена от начала до конца данной фазы существенно снижается. Содержание других идентифицированных данным методом полиацетиленов: 2,4-пентадинилбензена, капиллина – незначительно.

Качественную идентификацию некоторых компонентов эфирного масла проводили с использованием хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ). Для этого были опробованы различные хроматографические системы элюентов: хлороформ – бензол, гексан –

метилэтилкетон, гексан – этилацетат, гексан – диэтиловый эфир, бензол – ацетон, петролейный эфир – этилацетат – этанол, петролейный эфир – диэтиловый эфир, петролейный эфир – этилацетат в различных соотношениях. В качестве оптимальных для разделения и идентификации полиацетиленовых компонентов эфирного масла полыни метельчатой были выбраны системы растворителей гексан – метилэтилкетон (7:3) и гексан – этилацетат (9:1), для идентификации кумарина скопарона – петролейный эфир-этилацетат-этанол (4:1:1). Для визуализации результатов хроматографирования использовали реактивы: ванилин в кислоте серной разведённой и 1% раствор калия перманганата в 1% растворе кислоты хлористоводородной. Кроме того, имея ввиду фоточувствительность полиацетиленовых соединений, нами были проведены эксперименты по облучению разделённых на пластинках для ТСХ соединений с помощью УФ-облучателя (254 нм)».

С целью идентификации нами были использованы препаративно выделенные по известной методике скопарон, капиллен, капиллин и капиллол.

Идентификация скопарона. Светло-жёлтые кристаллы, с т. пл. 144,5-146 °С. УФ спектр (λ , нм): 230, 296, 344. Вещество имело ярко-синюю флюоресценцию в УФ свете, окрашивалось парами щелочи в лимонно-жёлтый цвет, а при воздействии диазореактива приобретало сине-зелёную окраску. Идентичность была также подтверждена методами ВЭЖХ и ТСХ со стандартным образцом.

Идентификация капиллена. В ЯМР спектре (δ м.д.): синглет 1,9 (метил при тройной связи), синглет при 3,65 (метилен), синглет 7,40 (протоны бензольного кольца). Полученные данные соответствовали структуре капиллена. Идентичность подтверждена методами ВЭЖХ и ТСХ сравнением со стандартным образцом.

Идентификация капиллина. После перекристаллизации из спирта кристаллическое вещество имело т. пл. 81-82 °С. В ЯМР спектре (δ м.д.): синглет при 2,1 (метил при двойной связи); мультиплеты 7,5 и 8,2 (пять протонов бензольного кольца). В УФ спектре наблюдались максимумы поглощения при λ_{\max} 271, 280 и 295 нм (этанол). Спектральные данные показали идентичность этого вещества капиллину (1-фенил-1-оксо-гексадиину-2,4).

Идентификация капиллола. Кристаллическое вещество т.пл. 85-86,5 °С (этанол). В УФ спектре (λ_{\max}) 267, 280, 293 нм. В ИК спектре (λ_{\max}) 3300 cm^{-1} (ОН-группа). В ЯМР спектре (δ м.д.): синглет при 2,0 ($\text{CH}_3\text{-C}\equiv$); синглет при 5,5 ($\text{C}=\text{C}-\text{CH}(\text{O})-\text{C}\equiv$); 7,25-7,6 (пять протонов бензольного кольца). Полученные спектральные характеристики были идентичны полиацетиленовому соединению – капиллолу.

Как следует из представленных на Рисунке 5 данных, ацетиленовые соединения (капиллин, капиллен, капиллол) и кумарин скопарон можно качественно идентифицировать методом ТСХ. Также установлено, что проявление зон адсорбции на хроматографической

пластинке с помощью УФ света позволяет качественно обнаружить ацетиленовые компоненты эфирного масла полыни метельчатой без использования агрессивных реагентов (проявителей).

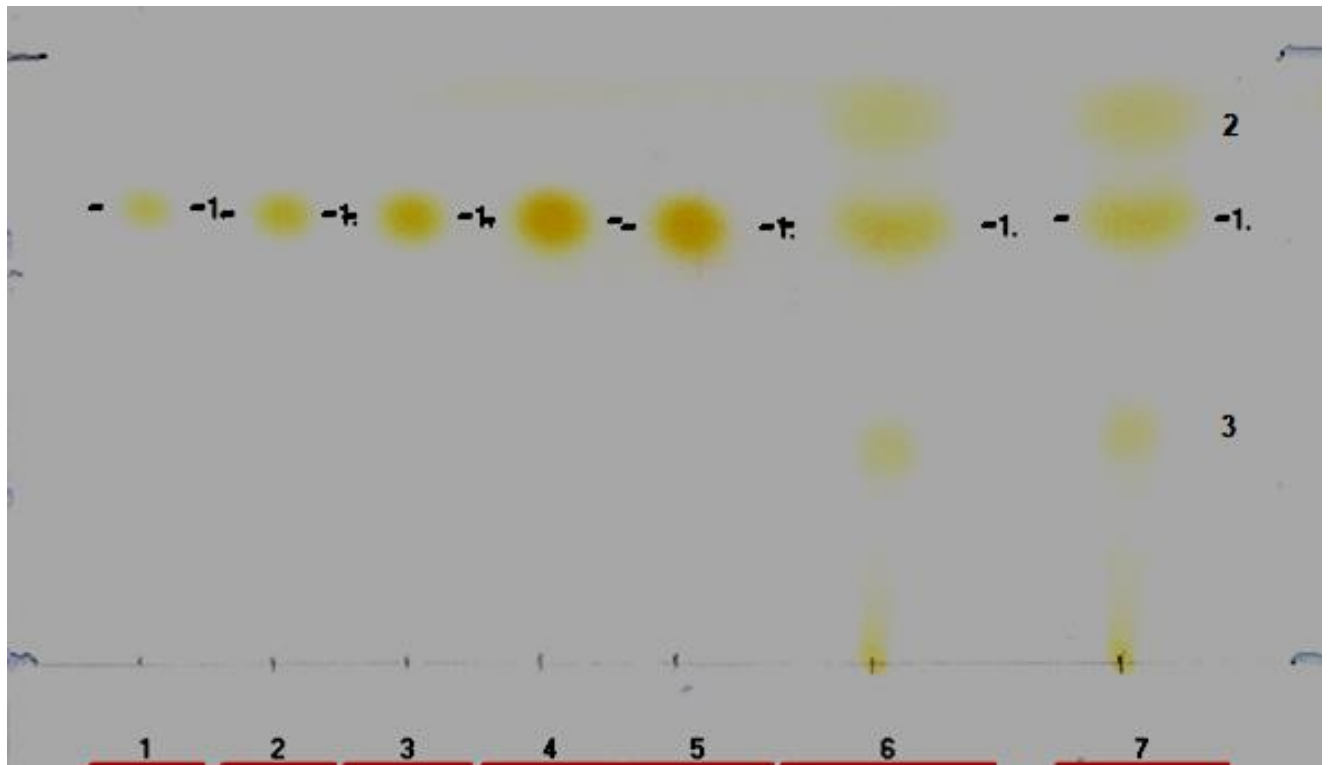


Рисунок 5 – Стандартная хроматограмма разделения полиацетиленовых компонентов эфирного масла (треки 6, 7) надземной части полыни метельчатой сорта «Таврида» в системе гексан – этилацетат 9:1 (после 5 минут облучения УФ светом); 1 – капиллин; 2 – капиллен; 3 – капиллол

Идентификацию и количественное определение капиллина в эфирном масле, полученном из надземной части, заготовленной в фазу ветвления побегов полыни метельчатой, проводили, используя оцифрованную хроматограмму (Рисунок 6). Валидационные характеристики разработанной методики представлены в Таблице 4.

Таблица 4 – Валидационные характеристики методики количественного определения капиллина в эфирном масле полыни метельчатой

Показатели валидации	Результат
Специфичность	Специфична
Предел обнаружения	13,7 мкг
Предел количественного определения	41,6 мкг
Линейность	$S = 1,1 \cdot 10^3 m$
Правильность	$X_{cp} = 103,7\%$; $X = 9,1\%$; $RSD\% = 9,9\%$; $E = 8,8\%$
Прецизионность	$X_{cp} = 9,65\%$; $X = 1,00\%$; $RSD\% = 9,9\%$; $E = 10,4\%$

Результаты фитохимического изучения надземной части полыни метельчатой сорта «Таврида», культивируемого в Никитском ботаническом саду – Национальном научном центре РАН позволяют сделать вывод о присутствии в составе этого сырья следующих групп биологически активных веществ: фенольные соединения (включая кумарины, флавоноиды, фенольные кислоты, дубильные вещества), полиацетиленовые соединения и аминокислоты (Таблица 5).

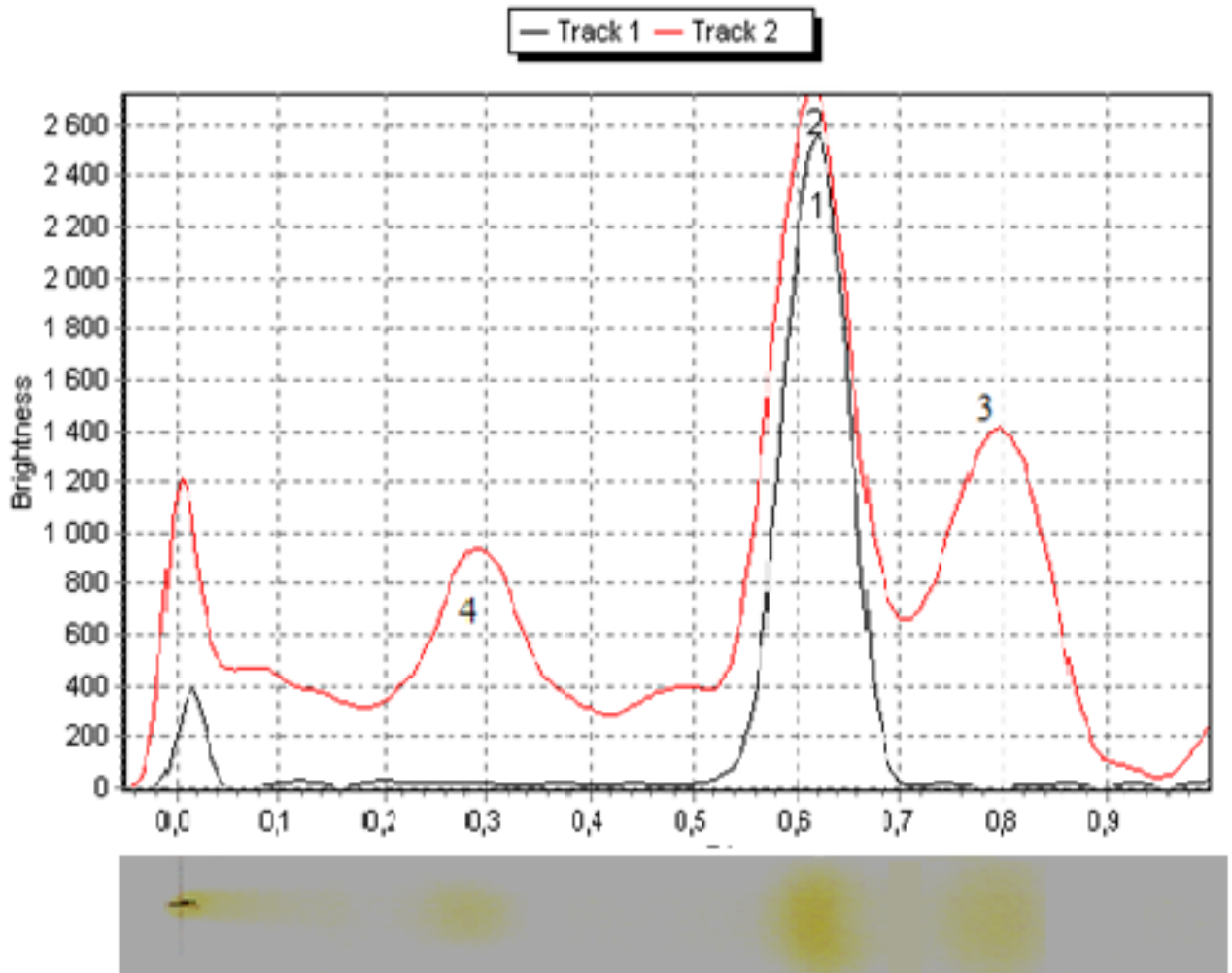


Рисунок 6 – Оцифрованная хроматограмма СО капиллина (1) и полиацетиленов эфирного масла полыни метельчатой: капиллина (2), капиллена (3), капиллола (4)

С помощью сверхкритической флюидной экстракции получено CO_2 -извлечение из надземной части полыни метельчатой. ГЖХ-МС анализ показал, что капиллен, капиллин, скопарон, триаконтан, спатуленол и эвгенол являются основными его компонентами.

В надземной части полыни метельчатой сорта «Таврида» обнаружен богатый состав аминокислот, а также макро- и микроэлементов, среди которых преобладают калий, кальций,

магний, фосфор, натрий.

Таблица 5 – Результаты фитохимического исследования надземной части полыни метельчатой

Группа БАВ	Метод	Результат
Фенольные соединения	ВЭЖХ-УФ	Идентифицированы кумарины: скопарон, скополетин, умбеллиферон; фенольная кислота – хлорогеновая
	ВЭЖХ-МС	Идентифицированы флавоноиды – лютеолин 6,8-ди-С-глюкозид; рутин; гиперозид; кемпферол-О-рутинозид и лютеолин; фенольные кислоты – хлорогеновая, 3,5-, 3,4- и 4,5-дикофеилхинные кислоты; кумарин – скополетин
	Спектрофотометрия в видимой области после реакции комплексообразования с алюминия хлоридом при длине волны 410 нм	Содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин и абсолютно сухое сырьё в фазу цветения составило $1,95 \pm 0,05\%$
Эфирное масло	ГЖХ-МС	Идентифицированы компоненты эфирного масла в образцах полыни метельчатой травы сорта «Таврида». В период цветения в эфирном масле преобладает полиацетиленовое соединение – капиллен
	ТСХ	Количественно определены ацетиленовые соединения: капиллол, капиллин, капиллен; кумарин – скопарон
СО ₂ - экстракт	ГЖХ-МС	В период начала цветения в СО ₂ -экстракте преобладают капиллен, капиллин, скопарон и триаконтан
Аминокислоты	Ионообменная хроматография с пост-колоночной дериватизацией нингидрином	Суммарное содержание аминокислот – 7,27%. Доминирующими аминокислотами являются пролин (1,03%), глютаминовая кислота (1,01%), аспарагиновая кислота (0,72%), лейцин (0,53%)
Минеральный состав	Полуколичественный спектральный анализ	Обнаружено 27 химических элементов, среди которых преобладали калий, кальций, магний, фосфор, натрий.

Прогноз вероятных путей реализации противовоспалительной активности основных действующих соединений из надземной части полыни метельчатой показал, что в этом процессе могут участвовать как хорошо известные вторичные мессенджеры (АКТ1), первичные мишени (ЦОГ-2), так и матричные металлопротеиназы (ММР2, ММР3 и ММР9).

Морфолого-анатомическое исследование

Высушенная надземная часть растения, срезанная на высоте 25-30 см над поверхностью почвы, состоит из цельных или частично облиственных цветоносных стеблей.

Стебель прямой, одиночный, в средней и верхней частях сильноветвистый, вначале опушённый, но во второй половине вегетационного сезона голый. Прикорневые и нижние стеблевые листья черешковые дважды или трижды перисторассечённые на линейные, острые дольки во время цветения опадающие. Средние стеблевые листья сидячие с нитевидными дольками. Корзинки округло-овальные или продолговато-яйцевидные, длиной 1,5-2 мм, состоят из шести цветков. Листочки обертки голые, собраны на ветвях односторонними кистями, образующими пирамидальную метёлку. Плод – яйцевидная, плосковатая, нитевиднорёбристая, бурая семянка длиной 0,6 мм. Цвет сырья жёлто-зелёный, вкус пряно-горький, запах сильный, ароматный.

В результате микроскопического исследования установлены диагностически значимые признаки:

1. Эпидермис верхней стороны листа слабо извилистостенный; с нижней стороны извилистостенный. Эпидермис цветков имеет длинные вытянутые клетки, расположенные неравномерно. Эпидермис стебля состоит из прямостенных клеток.
2. Устьичный аппарат аномоцитного типа, расположен с обеих сторон листа.
3. Эфиромасличные желёзки многочисленные, овальные, по типу астровых, окрашиваемые реактивом судан III в жёлто-оранжевый цвет.
4. Наличие Т-образных волосков, у которых поперечная клетка Т-образного волоска расположена перпендикулярно к клетке основания волоска или имеет V-образную форму в точке перехода к основанию. Длины ветвей Т-образного волоска разной длины.

Разработка показателей качества

Для стандартизации надземной части полыни метельчатой были установлены некоторые показатели качества (Таблица 6).

Таблица 6 – Результаты разработки некоторых показателей и норм качества сырья «Полыни метельчатой трава»

Показатели качества	Метод анализа	Нормы
Влажность	Согласно ОФС ГФ РФ XIV издания	Не более 7,0%
Зола общая		Не более 8,0%
Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте		Не более 1%

Продолжение таблицы 6

Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом этиловым 70%	Согласно ОФС ГФ РФ XIV издания	Не менее 19%
Количественное содержание хлорогеновой кислоты	ВЭЖХ	Не менее 0,1%
Количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на рутин	Спектрофотометрия	Не менее 1,5%

Для количественного определения суммы флавоноидов полыни метельчатой использовали метод УФ-спектрофотометрии. В качестве стандартного образца (СО) – рутин (Рисунок 7).

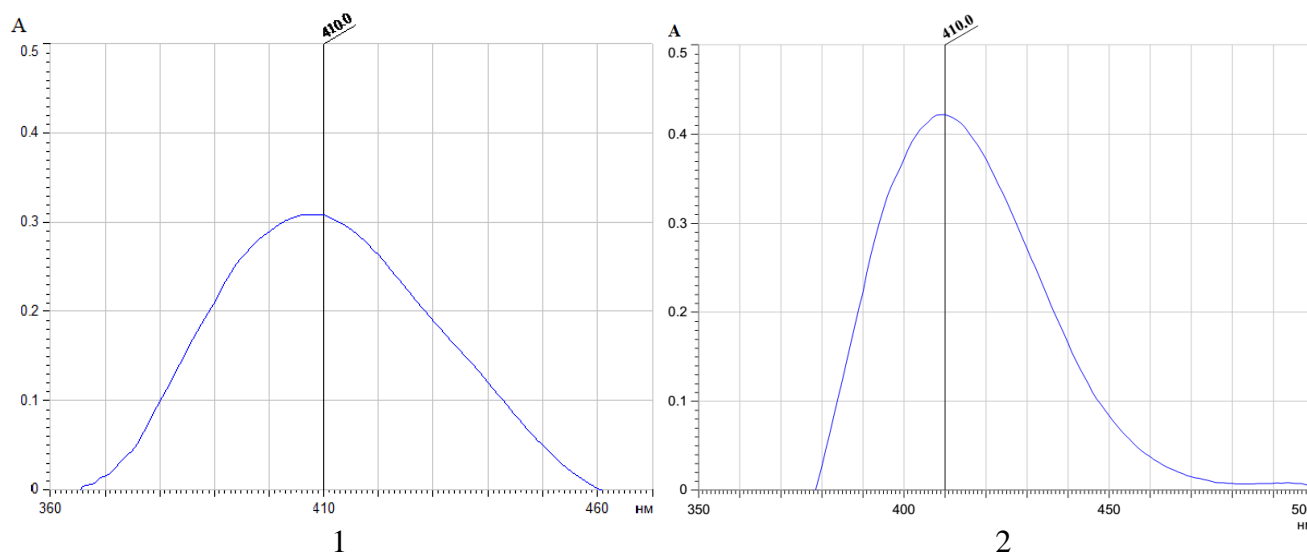


Рисунок 3 – Фрагменты спектров поглощения комплексов спиртового (70%) извлечения полыни метельчатой травы (1) и СО рутина (2) с алюминия хлоридом 2%

Результаты показывают, что максимальное содержание суммы флавоноидов достигается при использовании в качестве экстрагента спирта этилового 70%, степени измельченности сырья – 1 мм, времени экстракции – 60 минут, соотношении сырьё : экстрагент – 1 : 60. Максимумы поглощения в УФ-спектрах комплексов спиртового извлечения и спиртового раствора СО рутина с 2%-ным раствором алюминия хлорида показали батохромный сдвиг в область 410 нм.

Разработанная методика является линейной в пределах аналитической области от 0,1718 мг/мл до 0,7305 мг/мл суммы флавоноидов в пересчёте на рутин ($y = 0,7692x + 0,0085$; $R = 0,999$), специфичной, правильной ($RSD = 1,79\%$) и воспроизводимой ($\varepsilon = 2,73\%$). Как следует из полученных результатов, содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин в

исследуемом сырье составило $1,95 \pm 0,05\%$, а относительная погрешность определения не превысила 3%. При оценке качества «Полыни метельчатой травы» нормой содержания суммы флавоноидов в пересчёте на рутин рекомендовано значение – не менее 1,5% в пересчёте на абсолютно сухое сырьё.

Для количественного определения кислоты хлорогеновой в полыни метельчатой траве сорта «Таврида» использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию в режиме ступенчатого градиента с использованием подвижной фазы следующего состава: ацетонитрил – муравьиной кислоты водный раствор 0,1%. Детектирование осуществляли при длине волны 280 нм. Скорость потока – 0,7 мл/мин. Объём вводимой пробы – 20 мкл. Температура колонки 25 °С. Разработанная методика валидирована по основным показателям, что подтверждает возможность её использования для стандартизации сырья «Полыни метельчатой трава». В качестве нормы содержания кислоты хлорогеновой в данном сырье рекомендуется показатель – не менее 0,1% в пересчёте на абсолютно сухое сырьё.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполненных комплексных фармакогностических исследований был разработан новый вид лекарственного растительного сырья «Полыни метельчатой трава».

Основные результаты экспериментального исследования Полыни метельчатой травы отражены в следующих выводах:

1. Анализ доступной научной литературы по изучению надземной части полыни метельчатой показал, что исследователями, в основном, достаточно хорошо изучено эфирное масло, вариабельность состава которого определяется многими факторами, в том числе географическим местом произрастания, фазой роста и развития, экологическими и некоторыми другими факторами. Другие группы биологически активных веществ растения мало изучены. Для дикорастущих популяций полыни метельчатой характерна высокая степень полиморфизма. Для эфирного масла, полиацетиленовых и фенольных соединений из надземной части полыни метельчатой в научной литературе описаны разнообразные биологические и фармакологические эффекты.

2. Проведено фитохимическое изучение полыни метельчатой травы сорта «Таврида», культивируемого в Никитском ботаническом саду – Национальном научном центре РАН. В ходе анализа подтверждено наличие в извлечениях из надземной части фенольных (кумарины, флавоноиды, фенольные кислоты, дубильные вещества) и полиацетиленовых соединений; изучен состав аминокислот. Установлен качественный состав и количественное содержание компонентов эфирного масла. В надземной части полыни метельчатой с помощью хроматографических методов (препаративная ТСХ) и на основании спектральных данных (УФ-,

ИК-, ЯМР- и масс-спектров) идентифицированы полиацетиленовые соединения: капиллин, капиллен и капиллол; методами ВЭЖХ-УФ и ВЭЖХ-МС идентифицированы флавоноиды – лютеолин 6,8-ди-С-глюкозид; рутин; гиперозид; кемпферол-О-рутинозид и лютеолин; фенольные кислоты – хлорогеновая кислота, 3,5-, 3,4- и 4,5-дикофеилхинные кислоты; кумарины – скопарон, скополетин, умбеллиферон.

3. Проведено морфолого-анатомическое изучение надземной части полыни метельчатой. В качестве диагностических морфологических признаков Полыни метельчатой травы следует считать окраску стеблей, размер и окраску стеблевых листьев, характер соцветий; анатомических – строение Т-образных волосков и клеток эпидермиса.

4. Установлены показатели и нормы качества на Полыни метельчатой траву: влажность – не более 7%, золы общей – не более 8%, золы, нерастворимой в 10% растворе хлористоводородной кислоты, – не более 1%; экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 70%, – не менее 19%; содержание эфирного масла – не менее 1%; содержание кислоты хлорогеновой – не менее 0,1%; содержание суммы флавоноидов в пересчёте на рутин – не менее 1,5%. Разработаны нормы качества на эфирное масло полыни метельчатой сорта «Таврида».

5. Разработаны и валидированы методики количественного определения кислоты хлорогеновой методом ВЭЖХ и количественного определения суммы флавоноидов в пересчёте на рутин в сырье «Полыни метельчатой трава».

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Полученные в результате комплексного фармакогностического исследования данные позволяют рекомендовать полыни метельчатой траву для дальнейшего более глубокого фармакологического изучения. Практическое внедрение результатов проведённого в рамках направления подготовки «Фармация» диссертационного исследования в образовательную и научно-исследовательскую деятельность позволит расширить перспективы дальнейшего изучения и использования нового вида лекарственного растительного сырья – «Полыни метельчатой трава».

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Как новый вид лекарственного растительного сырья «Полыни метельчатой трава» требует дальнейшего всестороннего и более глубокого изучения. Расширение спектра фармакологических исследований, получение более полных данных о токсичности и побочных действиях извлечений и возможных фармацевтических субстанций на основе этого сырья позволит разработать новые эффективные и безопасные лекарственные средства, обладающие

актуальными для современной медицины фармакологическими свойствами. Перспектива изучения одной из основных групп действующих соединений предлагаемого сырья – полиацетиленовых соединений позволит существенно расширить знания и возможности дальнейшего практического применения этого и других видов уже используемого лекарственного растительного сырья.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Айрапетян, Э.Э.** Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в полыни метельчатой траве / **Э.Э. Айрапетян, В.Н. Леонова, Д.А. Коновалов** // **Человек и его здоровье.** – 2022. – Т. 25, № 2. – С. 105–112.
2. **Айрапетян, Э.Э.** Идентификация фенольных соединений в траве полыни метельчатой / **Э.Э. Айрапетян, М.В. Ларский, Д.А. Коновалов** // **Фармация.**– 2024. – Т. 73, № 4. – С. 14-17.
3. **Айрапетян, Э.Э.** Аминокислотный состав травы полыни метельчатой / **Э.Э. Айрапетян, О.М. Шевчук, Л.А. Логвиненко** // **Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.** – 2018. – № 2(66). – С. 122-124.
4. Pozdnyakov, D. The study of the anti-inflammatory activity of a stomatological gel based on an extract of *Artemisia scoraria* Waldst.et Kit. / **D. Pozdnyakov, E. Ayrapetyan, D. Konovalov** // **Journal of Research in Pharmacy.** – 2022. – Vol. 26, № 1. – P. 189-197. [Scopus]
5. Разработка и валидация методики определения капиллина в эфирном масле полыни метельчатой / **Э.Э. Айрапетян, Т.Д. Мезенова, О.М. Шевчук, Л.А. Логвиненко, Д.А. Коновалов** // **Вестник Волгоградского государственного медицинского университета.** – 2020. – № 1(73). – С. 173-176.
6. **Айрапетян, Э.Э.** Изучение эфирного масла и фенольных соединений полыни метельчатой селекции Никитского ботанического сада / **Э.Э. Айрапетян, Л.А. Логвиненко, Д.А. Коновалов** // **Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада.** – 2023. – № 147. – С. 28-36.
7. **Айрапетян, Э.Э.** Прогноз противовоспалительной активности основных компонентов полыни метельчатой методами сетевой фармакологии / **Э.Э. Айрапетян, Д.С. Золотых, Д.А. Коновалов** // **Современная наука и инновации.** – 2023. – № 3(43). – С. 283-292.
8. Quantification of scoparon in wormwood grass using thin-layer chromatography / **Е.Е. Ayrapetyan, T.D. Mezenova, I.D. Konovalova, D.A. Konovalov** // **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science.** – 2021. – Vol. 867. – P. 012169.
9. **Айрапетян, Э.Э.** Изучение некоторых показателей подлинности и качества эфирного масла полыни метельчатой / **Э.Э. Айрапетян** // **Молодая наука: материалы научно-практической конференции.** – Пятигорск, 2016. – С. 6-8.

10. **Айрапетян, Э.Э.** Использование ТСХ для количественного определения полиацетиленов в эфирном масле полыни метельчатой / **Э.Э. Айрапетян, Т.Д. Мезенова, Д.А. Коновалов** // Аналитическая хроматография и капиллярный электрофорез: материалы III Всероссийской конференции». – Краснодар, 2017. – С. 83.
11. **Айрапетян, Э.Э.** Фитохимический анализ и стандартизация травы полыни метельчатой / **Э.Э. Айрапетян, Д.А. Коновалов** // Человек и лекарство: сборник материалов XXV Российского национального конгресса. – Москва, 2018. – С.95.
12. **Айрапетян, Э.Э.** Разработка показателей и норм качества на лекарственное сырьё *Artemisiae scopariae herba* / **Э.Э. Айрапетян, Д.А. Коновалов** // Ароматические и лекарственные растения: интродукция, селекция, агротехника, биологически активные вещества, влияние на человека: тезисы международной научно-практической конференции. – Ялта, 2021. – С. 32.
13. **Айрапетян, Э.Э.** ГХ/МС анализ СО₂-экстракта на основе надземной части полыни метельчатой / **Э.Э. Айрапетян, А.М. Алиев, Д.А. Коновалов** // Вестник Южно-Казахстанской медицинской академии. – 2022. – № 4-2(98). – С. 33-37.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БАВ – биологически активные вещества

ТСХ – тонкослойная хроматография

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

УФ – ультрафиолетовый

МС – масс – спектрометрия

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

ИК – инфракрасный