

На правах рукописи



Чимитцыренова Людмила Ивановна

ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ARTEMISIA GMELINII WEB. EX STECHM. И РАЗРАБОТКА
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ЕЕ ОСНОВЕ

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Улан-Удэ – 2017

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Бурятский государственный университет» Министерства образования и науки Российской Федерации

Научный руководитель:

Раднаева Лариса Доржиевна - доктор химических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Коломиец Наталья Эдуардовна - доктор фармацевтических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» МЗ РФ / кафедра фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, профессор

Туртуева Татьяна Анатольевна - кандидат фармацевтических наук, Государственное автономное учреждение здравоохранения Республиканский клинический лечебно-реабилитационный центр «Центр восточной медицины» / аптека лекарственных трав, провизор-технолог

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «13» декабря 2017 г. в 15.00 часов на заседании диссертационного совета Д 999.140.03 при ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН по адресу: 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Бурятского научного центра СО РАН и на сайте ИОЭБ СО РАН: <http://igeb.ru>

Автореферат разослан « ___ » _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.б.н, доцент



Хобракова Валентина Бимбаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время рынок лекарственных средств растительного происхождения по данным ВОЗ неуклонно расширяется. Лекарственные средства растительного происхождения широко применяются при лечении воспалительных процессов верхних дыхательных путей, желудочно-кишечного тракта, печени и желчевыводящих путей и др., использование их признается безопасным и эффективным из-за низкой токсичности и отсутствия побочных эффектов. Биологически активные вещества (БАВ), образующиеся в растительной клетке, действуют комплексно, то есть сразу на все системы организма. Увеличивающаяся потребность в растительных средствах предопределяет расширение поиска перспективных растений с целью создания на их основе фитопрепаратов (Атажанова Г.А., 2008; Толстикова Т.Г., 2010; Крепкова Л.В., 2011; Васильев А.Н., 2014; WHO, 2016).

В этом плане представляют интерес растения рода *Artemisia* L., надземная часть и корни которых используются в народной и традиционной медицине России, Китая, Монголии, Японии, Кореи, Индии в качестве противовоспалительных, капилляроукрепляющих, желчегонных, противоопухолевых, антиоксидантных средств (Гусева А.П., 1961; Березовская Т.П., 1982; Асеева Т.А., 1985; Базарон Э.Г., 2002; Сейдахметова Р.Б., 2002; Жигжитжапова С.В., 2008; Раст. рес., 2012; Ballabh B., 2007; Gewali M.B., 2008). Единственным официальным растением из рода *Artemisia* L. является полынь горькая (*Artemisia absinthium* L.), произрастающая преимущественно в Европейской части России. Лекарственное растительное сырье и настойка данного вида применяются при заболеваниях желудочно-кишечного тракта (ГФ XI, 1989; ГФ XIII, 2015; Раст. рес., 1993).

Республика Бурятия с ее богатейшими запасами природных ресурсов, относится к одному из важнейших центров видообразования полыней - Ангарскому, где род *Artemisia* L. насчитывает 46 видов. Представители данного рода являются одними из ярко выраженных эдификаторов растительности степей Бурятии. Они имеют обширный ареал, большую сырьевую массу и являются богатыми источниками эфирного масла, лактонов, фенольных соединений и других биологически активных веществ (Тахтаджан А.Л., 1970; Березовская Т.П., 1991; Красноборов И.М., 1997; Намзалов Б.Б., 2001). К одним из таких растений относится полынь Гмелина (*Artemisia gmelinii* Web. ex Stechm.), которая является перспективным видом, широко произрастающая на территории Центральной Азии (Красноборов И.М., 1997; Раст. рес., 2012).

Цель и задачи исследования. Целью настоящей работы является фармакогностическое исследование *Artemisia gmelinii* Web. ex Stechm.,

стандартизация сырья (травы) и разработка лекарственных средств на ее основе.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. провести фармакогностическое изучение *A.gmelinii* травы, установить диагностически значимые признаки макро- и микроскопического строения сырья;

2. определить качественный состав и количественное содержание основных групп БАВ *A.gmelinii* травы, произрастающих в регионах Центральной Азии; провести стандартизацию сырья по доминирующим компонентам;

3. установить особенности распределения компонентов эфирного масла по органам и по фазам развития *A.gmelinii* в зависимости от места ее произрастания, а также терпеноидный состав CO₂-экстракта; провести скрининг и оценить антимикробную активность эфирного масла и настоя *A.gmelinii* травы;

4. разработать способы получения *A.gmelinii* настойки и *A.gmelinii* сиропа и создать нормативные документы: проект ФС на *A.gmelinii* траву, проекты ФСП на *A.gmelinii* настойку и *A.gmelinii* сироп.

Научная новизна работы. На основании макро- и микроскопического анализа установлены значимые основные признаки сырья: сильноизвилистые клетки нижнего эпидермиса и слабоизвилистые клетки верхнего эпидермиса листа; выпуклое голое цветоложе с обилием эфирномасличных железок; Т-образные и бичевидные волоски на обеих сторонах эпидермиса листа и листочках обертки; сосочковидные выросты на рыльце обоополого цветка; крупные, выступающие над поверхностью эфирномасличные железки на венчике пестичного цветка; определены урожайность *A.gmelinii* травы на конкретных зарослях в Иволгинском, Селенгинском, Хоринском районах и окрестности г. Улан-Удэ п. Орешково Республики Бурятия.

Определен качественный состав и количественное содержание основных биологически активных веществ (БАВ): эфирного масла, аминокислот, аскорбиновой кислоты, флавоноидов, дубильных веществ, органических кислот; идентифицированы протокатеховая и кофейная кислоты; жирнокислотный состав, в том числе преобладающие: пальмитиновая, линолевая, линоленовая кислоты; минеральный состав *A. gmelinii* травы представлен 25 элементами; разработаны методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин спектрофотометрическим методом и технология получения эфирного масла методом гидродистилляции из указанного сырья.

Установлена динамика накопления основных компонентов эфирного масла по органам, фазам вегетации и в зависимости от места произрастания

A.gmelinii травы. Общими компонентами эфирного масла для всех образцов являются камфен, α -пинен, β -пинен, 1,8 цинеол, камфора, γ -терпинен, борнеол, терпинеол-4, α -терпинен, α -терпинеол, терпинолен. Эфирное масло, выделенное из сырья, произрастающего на территории Монголии и Китая, отличается содержанием в значительном количестве артемизиа кетона, пиперитона, β -кубубена. В целом, более высокое содержание монотерпеновых соединений характерно для образцов из сырья Китая и Республики Бурятия, а содержание сесквитерпеновых соединений - для образцов из сырья Монголии; определены оптимальные сроки заготовки сырья – август (фаза цветения).

Установлены закономерности извлечения экстрактивных веществ и суммы флавоноидов из растительного сырья в зависимости от степени измельчения, типа экстрагента, соотношения сырье:экстрагент, позволяющих разработать способы получения *A. gmelinii* настойки и *A. gmelinii* сиропа.

Практическая значимость работы. На основании проведенных исследований разработаны и предложены:

– проект Фармакопейной статьи (ФС) на *A.gmelinii* траву (утверждено Ученым советом ФГБОУ ВО БГУ от 28.06.2017 г.);

– проекты Фармакопейной статьи предприятия (ФСП) *A.gmelinii* настойка и *A.gmelinii* сироп, лабораторный регламент на способ получения *A.gmelinii* настойки и *A.gmelinii* сиропа (утверждено Ученым советом ФГБОУ ВО БГУ от 28.06.2017 г.);

– методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в *A.gmelinii* траве и методические рекомендации по макро- и микроскопическому изучению *A.gmelinii* травы внедрены в учебный процесс на кафедре фармации Медицинского института Бурятского государственного университета (Акты внедрения от 14.06.2017 г.);

– способы получения *A. gmelinii* настойки и *A.gmelinii* сиропа внедрены в учебный процесс на кафедре фармации Медицинского института Бурятского государственного университета (Акты внедрения от 14.06.2017 г.).

Связь задач исследования с планами научных работ. Работа выполнена в соответствии с программой и планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет» по государственному заданию на НИР №19.11.68.2014/К (2014-2016 г.) «Исследование низкомолекулярных метаболитов растений флоры Северной Азии и создание с использованием традиций восточной медицины новых лекарственных средств широкого действия».

Личный вклад автора. Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, постановке цели и задач исследований, проведении экспериментальных работ, обобщении полученных данных и их статистической обработке, оформлении и представлении научных работ.

Соответствие диссертации паспорту научной деятельности. Научные положения диссертационной работы соответствуют пунктам 5, 6 паспорта специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на: International scientific conference «Current situation and future trends of drug research and development from natural sources» Monos 25 (Mongolia, Ulaanbaatar, 2015); Международной научно-практической конференции "Достижения и перспективы развития фитохимии" (Караганда, 2015 г.); Ежегодной научно-практической конференции преподавателей, сотрудников и аспирантов БГУ (Улан-Удэ, 2013 - 2016 гг.)

Публикации. По результатам исследований опубликовано 8 научных работ, из них 5 статей – в изданиях, рекомендованных ВАК МО и науки РФ.

На защиту выносятся:

– фармакогностическая характеристика *A.gmelinii* травы, включающая данные по внешним и анатомо-диагностическим признакам растительного сырья, запасам на конкретных зарослях в отдельных районах Республики Бурятия;

– установленный качественный состав и количественное содержание основных биологически активных веществ в *A.gmelinii* траве, в том числе особенности накопления и распределения компонентов эфирного масла по органам и фазам развития растения в регионах Центральной Азии;

– показатели качества *A.gmelinii* травы, настойки, сиропа;

– способы получения *A.gmelinii* настойки и сиропа.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 195 страницах машинописного текста, содержит 61 таблицу, 44 рисунка. Диссертация состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания объектов и методов исследований (глава 2), результатов собственных экспериментальных исследований (главы 3-5), общих выводов, приложения и списка литературы, включающего 217 источников, из которых 53 - на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследований

Объектом исследования служили образцы опытных партий сырья *A. gmelinii* травы, заготовленные в разные фазы развития растения в районах Республики Бурятия, Монголии и Китая с 2011 - 2016 гг. Для производства опытных партий настойки использовали траву, собранную в 2015-2016 гг, на территории Республики Бурятия, окрестности г. Улан-Удэ п. Орешково в фазу цветения.

В работе использованы реактивы, растворители и стандарты, отвечающие требованиям соответствующей нормативной документации.

Микроскопические исследования проводили с помощью микровизора μ-Vizo-101.

Качественный состав *A. gmelinii* травы проводили методом тонкослойной хроматографии на пластинах ПТСХ-П-А-УФ-254 «*Sorbfil*».

Микроэлементный анализ проводили на спектрографе ДФС-8 с плоскостной дифракционной решеткой для качественного и количественного спектрального анализа в области 200 -1000 нм.

Исследование фенолкарбоновых кислот проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе фирмы «Кнауер» (Германия), модель PlatinBlue с последующей компьютерной обработкой результатов исследования с помощью программы «Мультихром для Windows».

Определение лютеолина проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе марки «Agilent 1200», с тандемным масс-спектрометрическим детектором «ионная ловушка» 6330, способ ионизации электроспрей. Колонка Zorbax Eclipse C 18, 5 мкм, 4.6*150 мм (США).

Определение компонентного состава жирных кислот и эфирного масла проводили на газовом хроматографе Agilent Packard HP 6890 с квадрупольным масс-спектрометром HP MSD 5973N в качестве детектора (США).

Определение терпеноидного состава проводили на CO_2 – экстракторе марки HA 120 – 20 – 01 super critical extraction device Nantong city Hua'an super critical extraction device Co, Ltd (Китай).

Спектрофотометрическое определение биологически активных веществ, проводили с помощью спектрофотометра СФ-2000 и ПЭ-5400УФ в кварцевых кюветках с толщиной поглощающего слоя 10 мм.

Групповой состав эфирных масел обработан с помощью программного пакета *Sirius version 6.0*, фирмы Pattern Recognition Systems a/s, г. Берген, (Норвегия).

Изучение антимикробной активности проводили на питательной среде ГРМ-агара дискодиффузионным методом.

Настойку получали с помощью орбитального шейкера HS 501 digital ИКА (Германия).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Фармакогностическая характеристика *A. gmelinii* травы

Определены внешние признаки *A. gmelinii* травы: цельные или частично измельченные цветоносные, облиственные стебли длиной не более 35 см. Стебли прямостоячие, слегка ребристые, голые или в верхней части

опушенные. Листья ямчато-железистые, с верхней стороны зеленые, снизу сероватые или беловатые. Нижние и средние листья черешковые, у основания черешка с ушками. Пластинка листа овальная или продолговато-яйцевидная, на конце длиннозаостренная, дважды перисто-рассеченная. Конечные дольки ланцетные или линейно-ланцетные, пиловидно-зубчатые или цельнокрайние. Соцветие метельчатое. Корзинки слегка продолговатые или шаровидные, диаметром 2-3,5 мм, поникшие. Краевые цветки пестичные, венчик узкотрубчатый. Цветки диска обоеполые, венчик конический.

Анатомо-диагностические признаки: эпидермис листа представлен изодиаметрическими клетками с верхней стороны - слабоизвилистые, а с нижней - сильноизвилистые. Клетки покрыты кутикулой, образующей складчатость в местах прикрепления Т-образных волосков. Лист амфистоматический с устьицами аномоцитного типа, не погруженными в поверхность листа. Вдоль жилок листа проходят секреторные ходы, заполненные бурым маслянистым содержимым. Эфирномасличные железки крупные, сильно погруженные в мезофилл, двухрядные, 3-4 ярусные, 6-8 клеточные. Опушение с нижней стороны листа больше, чем с верхней стороны. На эпидермисе листа встречаются бичевидные и Т-образные волоски. Характерной особенностью последних является основание, состоящее из 2-3 клеток с тонкими оболочками. Цветоложе выпуклое, неопушенное по краю которого располагаются женские (10-15), а в центре обоеполые цветы (30-35). Цветы прикрепляются к цветоложу с помощью валиков-козинок, состоящих из нескольких рядов прямоугольных клеток. Клетки эпидермиса цветка прямостенные, в верхней части прозенхимные, в нижней части – почти квадратные. Пестичный цветок узко-трубчатый, незначительно расширенный к основанию. Эфирномасличные железки находятся на венчике цветка, выступают над поверхностью эпидермы. Обоеполый цветок широко-трубчатый, с короткими прямыми зубцами. Для венчика обоеполого цветка характерно наличие Т-образных волосков, имеющих 2-3 клеточное основание и многочисленные эфирномасличные железки прижатые и крупные. Для рыльца пестика обоеполого цветка характерно наличие сосочковидных выростов (рисунок 1).

Установлены запасы сырья в Иволгинском, Селенгинском, Хоринском районах и окрестности г. Улан-Удэ п. Орешково, которые показали, что урожайность составила до 112,40 г/м², эксплуатационный запас до 694,94 кг, а ежегодный объем заготовок до 173,14 кг.

Определены товароведческие показатели *A. gmelinii* травы, собранной в различных районах Республики Бурятия (Россия), Монголии и Китая в фазу цветения в период 2014 – 2015 гг., согласно ГФ XIII. На основании проведенных исследований установлены нормы: экстрактивных веществ, извлекаемых водой не менее 30 %, влажность не более 10 %, золы общей не

более 10 %, золы нерастворимой в хлористоводородной кислоте не более 1%, органической примеси не более 2 %, минеральной примеси не более 1 %, листьев побуревших и почерневших не более 3 %. Предложенные числовые показатели *A. gmelinii* травы включены в проект ФС на данный вид сырья.

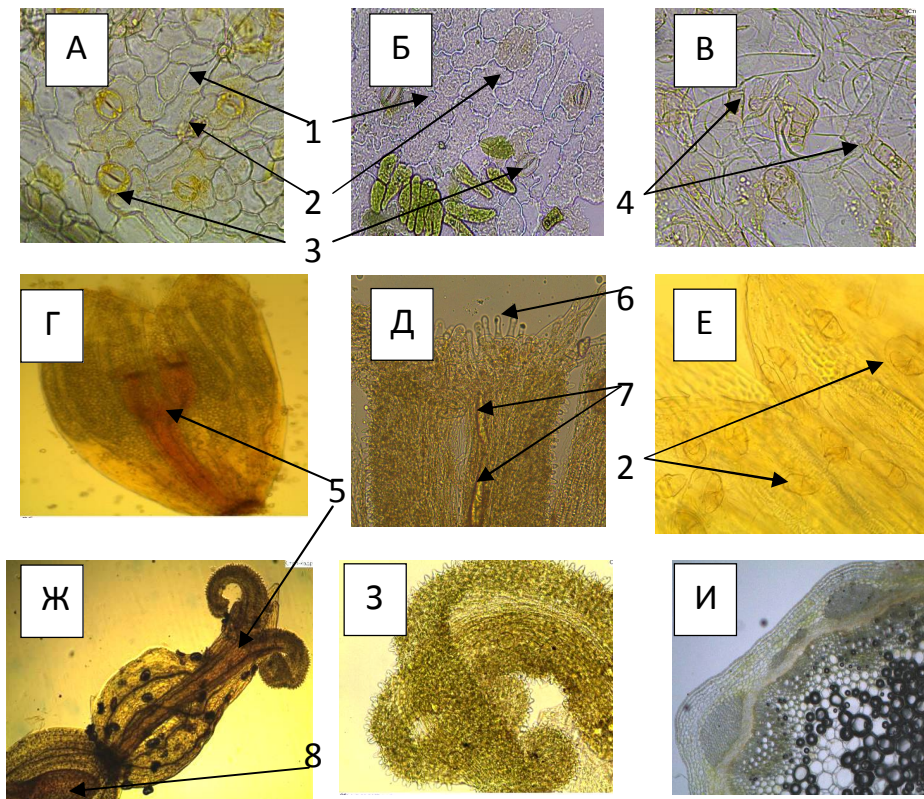


Рисунок 1 – *A. gmelinii* трава: А – фрагмент верхнего эпидермиса листа; Б, В – фрагменты нижнего эпидермиса листа (x150); 1 – клетки эпидермиса, 2 – эфиромасличные железы, 3 – устьица аномоцитного типа, 4 – Т-образные волоски; Г – обоеполый цветок (x150); Д – фрагмент пестика обоеполого цветка (x200); Е – фрагмент венчика обоеполого цветка (x200); Ж – пестичный цветок (x150); 5 – пестик, 6 – сосочковидные выросты на пестике обоеполого цветка, 7 – схизогенные вместилища, 8 – семянка; 3 – пыльцевоспринимающая ткань пестика (x200); И – фрагмент поперечного среза стебля (x200).

Качественный состав и количественное содержание биологически активных веществ в *A. gmelinii* траве

В *A. gmelinii* траве с помощью качественных реакций по общепринятым методикам обнаружены следующие группы биологически активных веществ: аминокислоты, аскорбиновая кислота, сапонины, полисахариды, флавоноиды, дубильные вещества, кумарины, жирные кислоты, углеводы, эфирное масло. Методом ТСХ идентифицированы аскорбиновая кислота и лютеолин.

Количественное определение БАВ в *A. gmelinii* траве проводили с использованием химических и физико-химических методов. Метрологические характеристики методик представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Метрологические характеристики методик количественного определения БАВ в *A. gmelinii* траве

БАВ	f	$X_{\text{ср}}$, %	S^2	S	P, %	t (P, f)	ΔX	E, %
Аскорбиновая кислота	4	1,53	0,00338	0,05814	95	2,78	0,06670	4,34
Аминокислоты	4	2,91	0,00108	0,03286	95	2,78	0,09135	3,14
Дубильные вещества	5	6,27	0,0024	0,04899	95	2,78	0,13619	2,18
Органические кислоты	4	1,09	0,00032	0,01789	95	2,78	0,04973	4,56

Определено содержание протокатеховой, кофейной кислот и лютеолина (таблица 2 и рисунок 2).

Таблица 2 – Содержание фенолкарбоновых кислот в водном извлечении *A. gmelinii* травы

№	Наименование кислоты	Содержание, мкг/мл
		водное извлечение
1	Протокатеховая кислота	1,62±0,05
2	Кофейная кислота	29,60±0,60

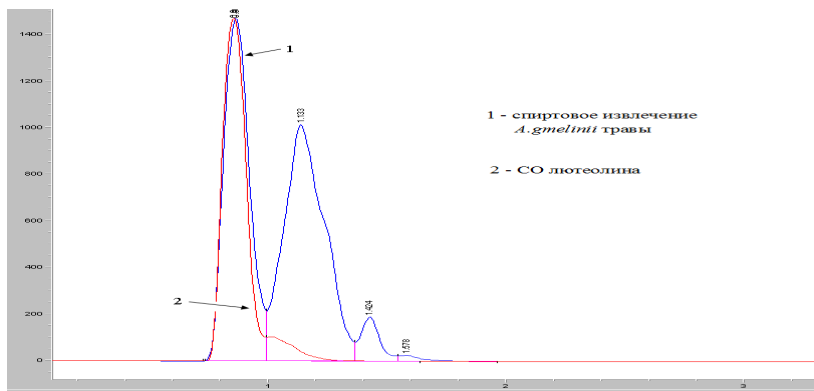


Рисунок 2 – Хроматограмма спиртового извлечения *A. gmelinii* травы (1), СО лютеолина (2).

Изучен липидный состав *A. gmelinii* травы, произрастающей в Республике Бурятия (31 компонент), Монголии (36 компонентов) и Китае (45 компонентов). В результате идентифицировано 17 жирных кислот, витамин Е, фитостеролы и другие соединения (таблица 3).

Таблица 3 – Компонентный состав липидной фракции *A. gmelinii* травы

№	Наименование	Содержание, %		
		Россия, Республика Бурятия, Иволгинский район	Китай, Провинция Цинхай	Монголия, Хэнтэйский аймак, Баян-улан уул
Ненасыщенные жирные кислоты				
1.	Линолевая кислота (18:2n6)	17,85	18,10	14,83
2.	Линоленовая кислота (18:3n3)	21,03	24,94	20,98
3.	Пальмитолеиновая кислота (16:1)	2,08	0,81	0,99
Насыщенные жирные кислоты				
4.	Сукциновая (бугандиовая)	-*	-	2,82
5.	Азелаиновая кислота (нонандиовая)	0,67	0,43	-
6.	Миристиновая кислота (14:0)	2,09	1,13	1,81
7.	Пентадекановая кислота (15:0)	0,58	0,79	0,79
8.	Пальмитиновая кислота (16:0)	22,85	17,68	20,68
9.	Маргариновая кислота (17:0)	0,79	-	-

продолжение таблицы 3

10.	Стеариновая кислота (18:0)	2,83	2,36	2,01
11.	Арахидоновая кислота (20:0)	2,56	2,00	1,36
12.	Генейкозановая кислота (21:0)	0,48	-	-
13.	Бегеновая кислота (22:0)	4,28	2,46	1,36
14.	Трикозановая кислота (23:0)	-	0,21	-
15.	Лигноцериновая кислота (24:0)	3,16	2,34	1,41
16.	Церотиновая кислота (26:0)	1,02	0,75	-
17.	Монтановая кислота (28:0)	1,03	0,28	-
Витамины				
18.	Витамин Е	1,43	0,41	2,69
Фитостеролы				
19.	Кампестерол	-	0,53	-
20.	Стигмастерол	0,94	2,36	1,16
21.	β -ситостерол	3,50	4,79	4,01
Другие соединения				
22.	α -амирин	0,80	1,11	-
23.	β -амирин	2,60	1,13	-

В *A. gmelinii* траве обнаружено 25 химических элементов. Макроэлементы представлены Mg, Ca, P, Na. Из микроэлементов преобладают Zn, Si, Cr, Fe, Al, Ni, Mn, Sr, Ba, Cr.

Разработка методик количественного содержания суммы флавоноидов и выделения эфирного масла

Для количественной оценки *A. gmelinii* травы предлагается спектрофотометрическая методика определения суммы флавоноидов в пересчете на СО лютеолина и методика выделения эфирного масла.

УФ-спектры комплексов спиртового извлечения *A. gmelinii* травы и СО лютеолина с алюминия хлоридом совпадали и характеризовались наличием максимума поглощения при длине волны 400 нм (рисунок 3).

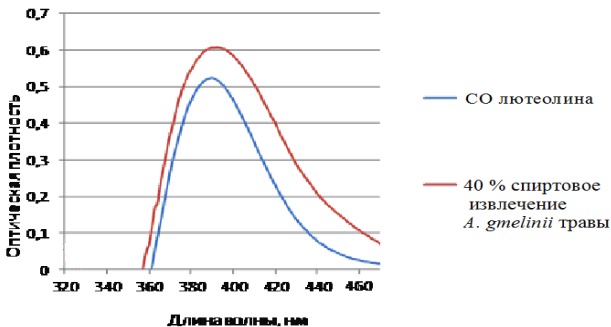


Рисунок 3 – Спектры поглощения комплексов 40 % спиртового извлечения *A. gmelinii* травы и раствора СО лютеолина с алюминия хлоридом.

Подобраны оптимальные условия для извлечения суммы флавоноидов из *A. gmelinii* травы: экстрагент – спирт 40 %, степень измельчения – 0,5 мм, соотношение сырья к экстрагенту 1:50, однократная экстракция на горячей водяной бане с обратным холодильником в течение 45 минут. Установлено, что содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в *A. gmelinii* траве составляет $1,65 \pm 0,04$ % (таблица 4).

Таблица 4 – Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в *A. gmelinii* траве

f	X _{ср} , %	S ²	S	P, %	t (P, f)	ΔX	E, %
4	1,65	0,00025	0,01581	95	2,78	0,04395	±2,66

Относительная ошибка единичного определения суммы флавоноидов в *A. gmelinii* траве составляет 2,66%. В связи с этим, по предлагаемой методике достаточно проводить анализ в пяти повторностях.

Изучение эфирного масла различных видов рода *Artemisia* L. Особенности накопления и распределения компонентов эфирного масла *A. gmelinii*

Проведен анализ компонентного состава эфирных масел, растений рода *Artemisia* L. флоры Бурятии. Для поиска потенциальных источников эфирного масла из растений рода *Artemisia* L. определен выход и компонентный состав эфирного масла 12 видов полыни флоры Бурятии. Для проведения скрининга были выбраны следующие виды: *A. vulgaris* L., *A. gmelinii* Web. ex Stechm., *A. frigida* Willd., *A. dracunculul* L., *A. commutata* Bess., *A. sericea* Web. ex Stechm., *A. annua* L., *A. messerschmidiana* Bess., *A. palustris* L., *A. adamsii* Bess., *A. siversiana* Willd., *A. scoparia* Waldst. et Kit., произрастающие в различных районах Республики Бурятия. По качественному составу основных компонентов эфирного масла полыни можно различать хемотаксономически. Например, *A. siversiana* содержит хамазулен, *A. annua* – артемизиа кетон, *A. frigida*, *A. gmelinii* – 1,8 цинеол, камфору, борнеол, *A. sericea* – гермакрен D. Наиболее распространёнными компонентами эфирного масла полыней Бурятии, произрастающих в резко-континентальном климате, являются α- и β-пинены, 1,8-цинеол, камфора, кариофиллен, β-селинен, терпинеол-4, гермакрен D, борнеол, спатуленол, бициклогермакрен и другие. Богатым источником перечисленных компонентов эфирного масла является *A. gmelinii* трава.

Изучен качественный состав и количественное содержание компонентов эфирного масла *A. gmelinii* травы в зависимости от степени измельчения и времени экстракции (таблица 5).

Таблица 5 – Компонентный состав эфирного масла *A. gmelinii* травы в зависимости от степени измельчения сырья

№	компонент	RI	Степень измельчения, мм				
			0,5	1	2	3	5
1	камфен	947	3,17	2,77	2,52	1,98	0,91
2	α -терпинен	1017	0,46	0,44	0,39	0,37	0,37
3	1,8-цинеол	1031	21,46	23,09	20,92	20,55	19,70
4	<i>o</i> -цимен	1039	2,99	2,48	2,12	2,20	2,00
5	γ -терпинен	1058	0,82	0,81	0,78	0,74	0,73
6	камфора	1144	25,55	25,31	25,01	24,55	23,14
7	борнеол	1166	24,49	23,85	23,32	23,05	22,92
8	терпинеол-4	1177	2,91	3,21	3,34	3,43	3,78
9	борнил ацетат	1287	5,70	5,58	5,72	6,47	6,70
10	гермакрен D	1484	1,41	1,17	0,81	0,64	0,67
Сумма всех соединений			85,91	88,72	86,54	89,02	88,02

Оптимальные условия для наибольшего выхода эфирного масла из растительного сырья: степень измельчения сырья – 0,5-2 мм, продолжительность экстракции – 2 часа. По разработанной методике получено эфирное масло *A. gmelinii* травы, где обнаружено 46 соединений, из них идентифицировано 40 компонентов. Метрологические характеристики методики представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Метрологические характеристики методики выхода эфирного масла из *A. gmelinii* травы

f	X_{cp} , %	S^2	S	P, %	t (P, f)	ΔX	E, %
4	0,72	0,00011	0,01049	95	2,78	0,02847	$\pm 3,95$

Основными компонентами эфирного масла травы являются 1,8-цинеол (20,92%), камфора (25,66%), борнеол (24,32%), борнилацетат (5,72%), камфен (2,52%), *o*-цимен (2,12%), терпинеол-4 (3,34%), α -терпинеол (1,53%), гермакрен D (0,81%), спатуленол (1,34%). Полученное эфирное масло *A.*

gmelinii травы представляет собой легкую подвижную жидкость светлого желтого цвета с характерным запахом. Компонентный состав эфирного масла *A. gmelinii* травы, полученного по разработанной методике, представлен на рисунке 4.

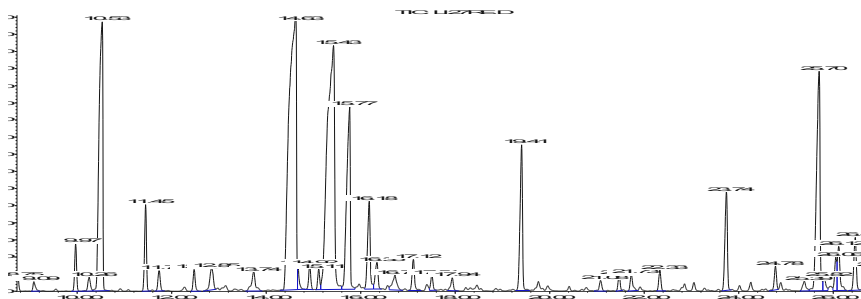


Рисунок 4 – Хроматограмма эфирного масла *A. gmelinii* травы.

Исследована динамика накопления эфирного масла в *A. gmelinii* траве по фазам вегетации растения и по органам для установления оптимальных сроков заготовки сырья. Отбор проб проводили в Иволгинском районе Республики Бурятия в 2013 г. Эфирное масло из образцов получали по разработанной методике (таблица 7).

Таблица 7 – Выход эфирного масла по фазам вегетации растения

№	Фаза развития/дата сбора сырья	Выход эфирного масла, %
1	Фаза вегетации / 28.06.2013	0,6-0,9
2	Фаза бутонизации / 25.07.2013	0,3-0,6
3	Фаза цветения / 25.08.2013	0,9-1,1
4	Фаза плодоношения / 13.09.2013	0,2-0,5

Установлено, что в зависимости от фазы развития растения из *A. gmelinii* травы извлекается до 1,1 % эфирного масла. Компонентный состав основных соединений на всех фазах развития растения сильно не меняется, меняется количественное содержание, которое увеличивается в фазу цветения. Доминирующими компонентами на всех фазах развития являются камфен (до 4,35%), 1,8-цинеол (до 28,17%), камфора (до 30,00%), борнеол (до 23,51%), терпинеол-4 (до 6,94%), гермакрен D (до 15,04%), борнил ацетат (до 6,45%), спатуленол (до 3,87%), кариофиллен оксид (до 2,37%). Оптимальным временем для сбора сырья является фаза цветения, так как количественное содержание монотерпеновых соединений достигает максимума, а

качественный состав доминирующих компонентов эфирного масла на всех фазах развития растения остается неизменным. Исследование динамики накопления эфирного масла по органам растения установило, что эфирное масло содержится во всех органах растения, таким образом, производится сбор всей надземной части растения. В эфирном масле, выделенном из листьев, сумма монотерпеновых соединений больше, чем в эфирном масле из соцветий - 81,95% и 65,72% соответственно. Содержание сесквитерпеновых соединений намного больше в соцветиях, чем в листьях - 21,60 % и 2,97 % соответственно. В стеблях сумма монотерпеновых соединений - 84,23 %, при этом качественный состав компонентов эфирного масла минимальный. Константные компоненты эфирного масла *A. gmelinii* представлены на рисунке 5.

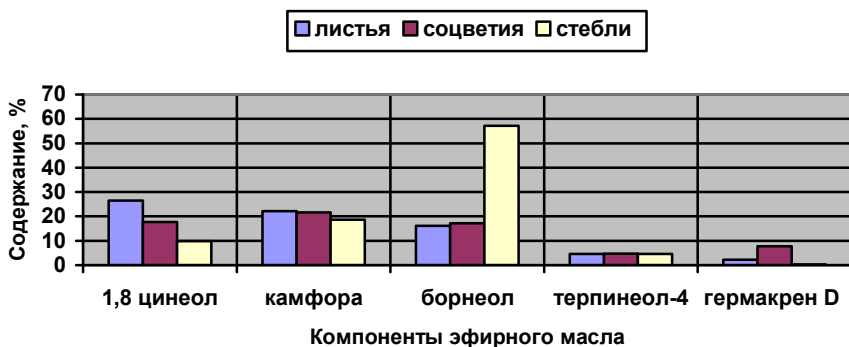


Рисунок 5 – Константные компоненты эфирного масла *A. gmelinii* травы из разных частей растения.

Проведено сравнительное исследование выхода и компонентного состава эфирного масла *A. gmelinii* травы в зависимости от места произрастания. Сбор проводили в фазу цветения, в 2014 г, в окрестности РК «Здоровье» Иволгинского района (1) и п. Орешково окрестности г. Улан-Удэ (2) Республики Бурятия (Россия); окрестности горы Баян-Улан уул (3) и местности Бэрх (4) Хэнтэйского аймака (Монголия), в т. 58 (5) и т. 61 (6) провинции Цинхай (Китай). Выход эфирного масла различен в зависимости от места сбора - от 0,47 % до 0,76 %.

Основными доминирующими компонентами эфирного масла *A. gmelinii* являются монотерпеновые соединения: 1,8 цинеол (от 15,06 % до 29,97 %), камфора (от 19,20 % до 36,93 %), терпинеол-4 (от 2,37 % до 5,67 %), камфен (от 1,34 % до 4,35 %), α-пинен (от 0,25 % до 0,97 %), β-пинен (от 0,23 % до 0,62 %), α-терпинен (от 0,71 % до 1,17 %), борнеол (от 1,96 % до 11,37 %), α-

терпинеол (от 0,85 % до 1,54 %), γ -терпинен (от 0,65 % до 2,03 %), которые содержатся во всех образцах. В образцах из Китая обнаружены йомоги спирт (до 0,83 %), артемизиа кетон (до 12,47 %), артемизиа спирт (до 1,12 %), что соответствует данным литературы (Haider, S. Z. et al., 2012). Из сесквитерпеновых соединений обнаружено наибольшее содержание спатуленола (от 0,56% до 1,38%) во всех образцах, гермакрена D (от 10,96 до 12,30%), бициклогермакрена (от 0,12% до 1,47%) (таблица 8).

Таблица 8 – Основные компоненты эфирного масла *A. gmelinii* травы в зависимости от места произрастания

№	компонент	RI	1	2	3	4	5	6
Монотерпеновые соединения								
1	α -пинен	932	0,60	0,92	0,25	0,26	0,47	0,97
2	камфен	947	3,03	4,35	1,88	1,96	1,34	3,62
3	β -пинен	975	0,62	0,50	0,23	0,24	0,45	0,41
4	йомоги спирт	1001					0,83	0,27
5	α -терпинен	1017	0,71	+	+	1,17	0,81	0,81
6	1,8 цинеол	1031	15,06	28,17	20,80	21,66	22,59	29,97
7	<i>o</i> -цимен	1039				1,47	1,63	0,85
8	γ -терпинен	1058	1,50	0,65	1,94	2,03	1,44	1,73
9	артемизиа кетон	1062					12,47	0,97
10	артемизиа спирт	1084					1,12	+
11	терпинолен	1088	0,42	0,20	0,52	0,54	0,41	0,36
12	цис- <i>p</i> -мент-2-ен-1-ол	1121	0,55	0,46	0,50	0,51	0,51	0,55
13	камфора	1144	21,76	30,00	23,40	23,56	19,20	36,93
14	борнеол	1166	11,37	18,18	6,22	6,48	2,55	1,96
15	сантолина спирт	1173						0,33
16	артемизиа спирт	1174					+	
17	терпинеол-4	1177	4,26	2,37	5,44	5,67	2,99	3,33
18	α -терпинеол	1191	1,54	0,93	1,27	1,31	0,85	0,93
19	борнил ацетат	1287	0,89	3,94			0,47	0,17
Сесквитерпеновые соединения								
20	кариофиллен	1422		0,46	2,69			1,40
21	9-эпикарифиллен	1469	3,99			2,80	1,79	
22	гермакрен D	1484	10,96	1,00	11,85	12,30		1,98
23	α -зингиберен	1496	1,25		3,89	3,92		
24	капиллен	1498					1,87	
25	бициклогермакрен	1500	1,47	+	1,23	1,35		0,12
26	спатуленол	1580	1,38	0,56	0,84	0,80	0,82	1,13
27	кариофиллен оксид	1586	1,05	0,54		0,64	0,38	1,51

Методом CO₂-экстракции изучен терпеноидный состав *A. gmelinii* травы. В гексановом извлечении CO₂-экстракта идентифицировано 25 соединений, которые соответствуют компонентам эфирного масла. В его составе больше монотерпеновых соединений (88,75%) и ациклических углеводов (6,85%). Сесквитерпеновых соединений (2,91%) по содержанию меньше как качественно, так и количественно.

Исследование компонентного состава эфирного масла *A.gmelinii* травы методом главных компонент

Исследован компонентный состав эфирного масла с помощью анализа многомерных данных, основанного на групповом составе эфирного масла из регионов Центральной Азии (Россия (Бурятия, Иркутская область), Монголия, Китай, Непал) (Соктоева Т.Э., 2011; Haider S. Z. et al., 2012). На графике счетов (ГК-модель) видно, что разделение на кластеры соответствует группировке образцов по экологическим факторам. Это могут быть температура воздуха, влажность и состав почвы, высота над уровнем моря и другие. Основной кластер моно- и бициклических монотерпеновых соединений составляют образцы аридных условий произрастания из Бурятии и окрестности горы Баян-Улан уул Хэнтэйского аймака Монголии. Для них характерны схожие климатические условия с недостаточным увлажнением, тогда как Монголия находится выше - на высоте 900-1500 м над уровнем моря (рисунок 6).

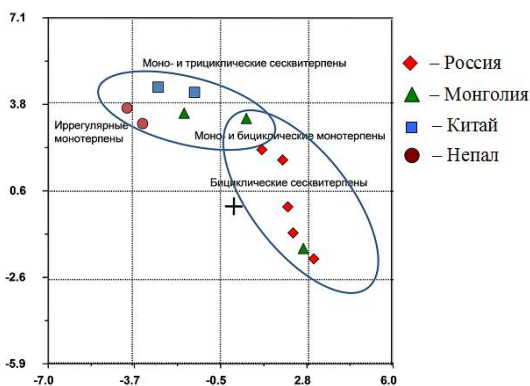


Рисунок 6 - ГК-модель данных группового анализа эфирного масла *A. gmelinii* травы из регионов Центральной Азии.

Для данной группы также характерно содержание бициклических сесквитерпеновых соединений, которых больше в образцах из Иркутской области (Россия), Булганского аймака (Монголия). Для них характерно более высокое увлажнение без резких колебаний температуры. При переходе от

первого ко второму кластеру находятся образцы из местности Бэрх Монголии, провинции Цинхай Китая и Непала, которые содержат моно- и трициклические сесквитерпеноиды, с высоким содержанием иррегулярных монотерпеноидов. Данные территории характеризуются высоким увлажнением, резкими колебаниями температуры, а также высотой над уровнем моря. Таким образом, можно предположить, что на биосинтез терпеноидов оказывают влияние климатические условия, степень увлажнения мест произрастания, высота над уровнем моря. При переходе от аридных к высокогорным территориям происходит увеличение содержания в эфирном масле моно- и трициклических сесквитерпеноидов и иррегулярных монотерпеноидов.

Изучена антибактериальная активность эфирного масла, настоя *A. gmelinii* травы в отношении стандартных штаммов: *Escherichia coli*, *Escherichia auregenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium diphtheria gravis tox*, *Salmonella enteriditis*, *Streptococcus faecalis*. Для исследования были взяты образцы, произрастающие в п. Орешково окрестности г.Улан-Удэ, Иволгинском, Хоринском, Селенгинском районах Республики Бурятия. Полученные данные свидетельствуют о наличии умеренно выраженной антибактериальной активности эфирного масла *A. gmelinii* травы в отношении штаммов *Escherichia coli*, *Escherichia auregenes*, *Corynebacterium diphtheria gravis tox*, *Salmonella enteriditis* и антибактериальной активности в отношении штамма *Streptococcus faecalis*. В отношении штамма *C.d.grauvitis tox* выраженное бактериостатическое действие показал настой *A. gmelinii* травы. Установлен компонентный состав эфирного масла в настое (рисунок 7).

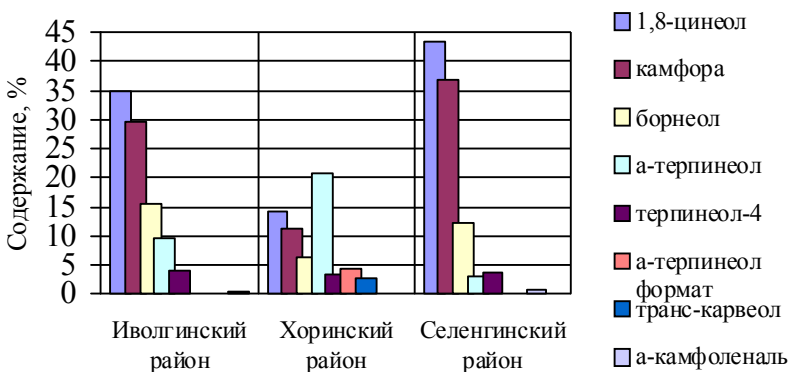


Рисунок 7 – Содержание компонентов эфирного масла в настое *A. gmelinii* травы

По результатам анализа видно, что в настой переходят доминирующие компоненты эфирного масла: 1,8-цинеол (до 43,29 %), камфора (до 36,80 %), борнеол (до 15,64%), терпинеол-4 (до 4,20 %), α -терпинеол (20,94 %).

Разработка способа получения *A. gmelinii* настойки, *A. gmelinii* сиропа и их стандартизация

С целью расширения ассортимента ЛС предложен способ получения *A. gmelinii* настойки. Для этого были изучены параметры экстрагирования, влияющие на выход биологически активных веществ из *A. gmelinii* травы: экстрагент – спирт 40 %, степень измельчения сырья – 1 мм, соотношение экстрагента к сырью – 1:5, кратность -3 и продолжительность экстракции 5 часов на роторном шейкере.

При стандартизации *A. gmelinii* настойки для определения БАВ с использованием качественных реакций и метода тонкослойной хроматографии установлено содержание флавоноидов, дубильных веществ, полисахаридов, аминокислот, аскорбиновой кислоты. По ранее разработанной методике определено количественное содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин и изучены компоненты эфирного масла методом ГХ-МС в *A. gmelinii* настойке (таблица 9 и рисунок 8).

Таблица 9 – Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в *A. gmelinii* настойке

F	$X_{\text{ср}}$, %	S^2	S	P, %	t (P, f)	ΔX	E, %
5	0,23	0,00005	0,00707	95	2,37	0,00751	3,26

Определено, что содержание суммы флавоноидов в *A. gmelinii* настойке 40% составляет $0,23 \pm 0,007$ %.

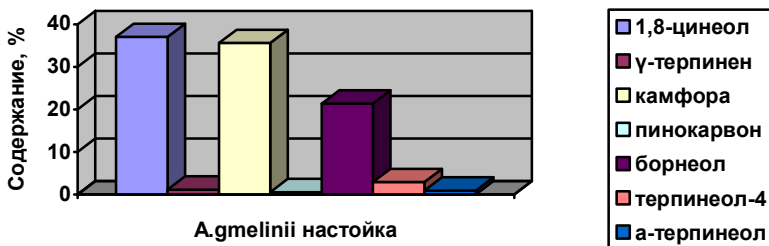


Рисунок 8 – Содержание компонентов эфирного масла в *A. gmelinii* настойке.

Таким образом, *A. gmelinii* настойка представляет собой прозрачную жидкость, темно - коричневого цвета, с характерным запахом, горького вкуса.

Лекарственной формой, в которой можно наиболее мягко скорректировать своеобразный вкус *A. gmelinii* настойки, обладающей горьким вкусом, является сироп. В качестве основы сиропа выбрана сахароза в концентрации 64% по массе (Муравьев Д.А., 1980). В состав сиропа был выбран консервант натрия бензоат.

Идентификацию флавоноидов проводили методом ТСХ. При разработке методики количественного определения суммы флавоноидов в *A. gmelinii* сиропе использованы подходы, разработанные для *A. gmelinii* травы. Количественное определение суммы флавоноидов в *A. gmelinii* сироп, в пересчете на лютеолин, проводили методом спектрофотометрии при длине волны 400 нм. Метрологические данные приведены в таблице 10.

Таблица 10 – Метрологические характеристики методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в *A. gmelinii* сироп

F	X _{ср} , %	S ²	S	P, %	t(P, f)	ΔX	E, %
5	0,023	0,00000105	0,0000102	95	2,37	0,00109	4,70

Установлено, что содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в *A. gmelinii* сироп составляет 0,023±0,001 %.

A. gmelinii сироп представляет собой вязкую жидкость светло - коричневого цвета со специфическим запахом, горьковатого, слегка вязущего вкуса. Растворим в спиртовых растворах (40% - 70%), в горячей воде.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Выявлены анатомо-диагностические признаки *A. gmelinii* травы: сильноизвилистые клетки нижнего эпидермиса и слабоизвилистые клетки верхнего эпидермиса листа; выпуклое голое цветоложе с обилием эфирномасличных железок; Т-образные и бичевидные волоски на обеих сторонах эпидермиса листа и листочках обертки; сосочковидные выросты на рыльце обоюполого цветка; крупные, выступающие над поверхностью эфирномасличные железки на венчике пестичного цветка.

2. Установлены запасы *A. gmelinii* травы разных районах Республики Бурятия методом учетных площадок: урожайность сырья варьирует от 112,40 г/м²; эксплуатационный запас до 694,94 кг, а возможный объем заготовок до 173,14 кг.

3. Доказаны содержание в *A. gmelinii* траве эфирного масла, аминокислот, аскорбиновой кислоты, флавоноидов, дубильных веществ, органических

кислот; идентифицированы протокатеховая и кофейная кислоты; жирнокислотный состав, в том числе преобладающие: пальмитиновая, линолевая, линоленовая кислоты; минеральный состав *A. gmelinii* травы представлен 25 элементами, среди эссенциальных микроэлементов преобладают Zn, Si, Cr, Fe, Ni, Mn, Sr.

4. Изучен качественный и количественный состав эфирного масла 12 видов рода *Artemisia* L., произрастающих на территории Республики Бурятия. Определена динамика накопления эфирного масла из *A. gmelinii* по органам и по фазам вегетации. Изучено влияние климато-географических факторов на выход эфирного масла из образцов *A. gmelinii*, собранных в разных регионах Центральной Азии: Бурятии, Монголии, Китае.

5. Обоснован выбор методики стандартизации *A. gmelinii* травы, подобраны оптимальные условия экстракции сырья для увеличения выхода эфирного масла. На 5 сериях сырья, собранных в разных районах Бурятии определены показатели качества сырья и нормы содержания эфирного масла; разработана спектрофотометрическая методика количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин в *A. gmelinii* траве.

6. Разработаны и предложены способы получения *A. gmelinii* настойки и *A. gmelinii* сиропа; установлены показатели качества настойки и сиропа из *A. gmelinii* травы; созданы и утверждены проекты ФС «*A. gmelinii* трава», ФСП «*A. gmelinii* настойка» и «*A. gmelinii* сироп».

7. Установлена антимикробная активность эфирного масла, настоя *A. gmelinii* травы в отношении условно патогенных бактерий.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Чимитцыренова, Л.И. Состав липидной фракции *Artemisia gmelini* Web. ex Stechm. из флоры Центральной Азии [Электронный ресурс] / Л.И. Чимитцыренова, В.В.Тараскин, С.В. Жигжитжапова, Л.Д. Раднаева // Современные проблемы науки и образования.— 2015. — № 2 - 3. Режим доступа: <http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=23833>

2. Жигжитжапова, С.В. Анатомо-диагностические признаки и компонентный состав эфирного масла травы полыни Гмелина / С.В. Жигжитжапова, Л.И. Чимитцыренова, Е.П. Дыленова, Л.Д. Раднаева // Молодые ученые и фармация XXI века: Сборник научных трудов третьей научно-практической конференции. – М., 2015. – С. 259-265.

3. Чимитцыренова, Л.И. Изучение состава жирных кислот и стеридов надземной части *A. Gmelinii* Web.ex Stechm. флоры Бурятии и Монголии / Л.И. Чимитцыренова, В.В. Тараскин, С.В. Жигжитжапова, Л.Д. Раднаева // "MONOS - Innovation 2015" International conference — Ulaanbaatar, 2015. — P. 30-34.

4. Раднаева, Л.Д. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в полыни Гмелина /Л.Д. Раднаева, Л.И. Чимитцыренова, С.В. Жигжитжапова, Е.П. Дыленова, Т.Э. Рандалова // Научное обозрение — 2016. —№ 5. —С. 128-133.

5. Жигжитжапова, С.В. Эфирные масла *Artemisia vulgaris* L., произрастающей на территории Республики Бурятия: состав и сравнение с литературными данными / С.В. Жигжитжапова, Т.Э. Рандалова, Л.Д. Раднаева, В.В. Тараскин, Л.И. Чимитцыренова // Фундаментальные исследования. - 2014. - № 8. - С. 68-73.

6. Жигжитжапова, С.В. Компонентный состав эфирного масла полыни холодной флоры Бурятии / С.В. Жигжитжапова, Л.Д. Раднаева, Л.И. Чимитцыренова // Вестник Бурятского государственного университета: Выпуск Медицина. - 2013. - №12. -С. 71-74.

7. Randalova, T.E. Pharmacognostic characteristics of the *Artemisia* L. of Buryatian flora/ S.V. Zhigzhitzhapova, L.D. Radnaeva, L.I. Chimittsyrenova // Achievements and prospects for the development of Phytochemistry —2015. — P. 42.

8. Жигжитжапова, С.В. Эфирное масло *Artemisia sieversiana* Willd. и разработка эмульсионных композиций на его основе / С.В. Жигжитжапова, Д.В. Попов, Е.Ц. Пинтаева, Л.Д. Раднаева, Л.И. Чимитцыренова, Т.Э. Рандалова // Химико-фармацевтический журнал. - 2017 - Т. 51, № 5. - С. 44-46.