

## АНОТАЦІЯ

Москаленко А.М. Фармакогностичне дослідження безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*) та створення на його основі нових лікарських засобів – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 226 «Фармація, промислова фармація» (22 – Охорона здоров'я). – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2021.

Дисертаційна робота присвячена комплексному фармакогностичному дослідженню сировини безсмертника приквіткового, розробці технології одержання лікарського засобу на основі досліджуваної сировини, розробці методів, параметрів та критеріїв стандартизації трави, квіток та рідкого екстракту квіток безсмертника приквіткового. Також здійснено дослідження антимікробної та протигрибкової дії та антиоксидантної активності рідкого екстракту безсмертника приквіткового.

У дисертаційній роботі наведено результати власного комплексного фармакогностичного вивчення якісного складу та вмісту біологічно активних речовин (БАР) трави та квіток безсмертника приквіткового, які встановлювали за допомогою хімічних і фізико-хімічних методів аналізу та хроматографічного аналізу (хроматографія на папері, тонкошарова, рідка і газова). Також застосовувався метод спектрофотометрії та метод емісійної абсорбції.

Вперше в результаті проведених випробувань у всіх досліджуваних об'єктах вивчено якісний склад та визначено вміст БАР різних класів: речовин фенольного характеру, зокрема флавоноїдів і фенолкарбонових кислот, вуглеводів, органічних та жирних кислот, летких сполук і амінокислот. Встановлено мінеральний склад досліджуваної сировини.

Запропоновано метод спектрофотометрії для визначення суми флавоноїдів у сировині та рідкому екстракті квіток безсмертника приквіткового.

При дослідженні фенольних сполук за допомогою різних фізико-хімічних методів було ідентифіковано у траві та квітках безсмертника приквіткового такі

флавоноїди: цинарозид, лютеолін, ізо-орієнтин, брактеїн, цернуозид, ауреузидин, кверцетин, кверцетину-3-О-β-D-глюкозид, апігенін, кемпферол. Вміст суми флавоноїдів, який визначали спектрофотометричним методом, склав для трави  $2,18 \pm 0,02$  %, для квіток  $1,61 \pm 0,01$  %, у перерахунку на цинарозид і суху сировину.

У сировині безсмертника методом ВЕРХ вперше було ідентифіковано ряд фенолкарбонових кислот, зокрема: галову, гідроксифенілоцтову, кофейну, кумарову, ферулову, синапову, коричну та хінну. При цьому у найбільшій кількості в квітках знаходиться хінна (4981,55 мкг/г), синапова (4500,11 мкг/г) і кумарова (3092,03 мкг/г) кислоти, в траві серед фенолкарбонових кислот основною є хінна кислота (44257,10 мкг/г). Інші фенолкарбонові кислоти містяться в значно менших кількостях.

Серед органічних кислот, які досліджували методом ВЕРХ у траві та квітках безсмертника приквіткового, вперше було виявлено: винну, піровиноградну, ізолимонну, лимонну, бурштинову та яблучну кислоти. При цьому у великій кількості в квітках знаходиться ізолимонна (22979,68 мкг/г), бурштинова (7847,18 мкг/г) та лимонна (2643,01 мкг/г) кислоти. У траві домінуючими органічними кислотами є ізолимонна (67613,38 мкг/г), яблучна (24917,49 мкг/г) і бурштинова (11515,72 мкг/г). Інші органічні кислоти представлені в значно менших кількостях, їх частка становила для квіток – 4284,04 мкг/г, для трави – 9295,70 мкг/г.

При визначенні амінокислот у сировині методом ТШХ було вперше ідентифіковано такі незамінні амінокислоти: валін, ізолейцин, лейцин, лізин, метіонін, треонін, фенілаланін. Серед замінних амінокислот було виявлено: аланін, аргінін, аспарагінову кислоту, гістидин, гліцин, глютамінову кислоту, пролін, серин, тирозин. Вміст амінокислот досліджували методом ВЕРХ. Серед незамінних амінокислот у квітках безсмертника приквіткового переважає лейцин (201,9 мг/100 г), серед замінних амінокислот у квітках домінують глютамінова і аспарагінова кислоти (407,2 мг/100 г і 341,2 мг/100 г відповідно). У траві серед незамінних амінокислот найбільше представлені лейцин (351,2 мг/100 г), фенілаланін (229,5 мг/100 г) і валін (225,1 мг/100 г); серед замінних амінокислот – глютамінова і аспарагінова кислоти (606,1 мг/100 г і 481,8 мг/100 г відповідно).

У результаті ідентифікації та дослідження вмісту вуглеводів у сировині безсмертника приквіткового методом газової хроматографії з мас–спектрометричним детектуванням (ГХ/МС) вперше було встановлено, що в квітках знаходяться в значних кількостях вільні цукри: сахароза (12,35 мг/г), глюкоза (10,43 мг/г) та зв'язані цукри: глюкоза (21,97 мг/г), фукоза (21,38 мг/г), арабіноза (7,98 мг/г). У траві безсмертника приквіткового серед ідентифікованих вільних цукрів у великих кількостях представлені: сахароза (9,08 мг/г), глюкоза (7,37 мг/г), серед зв'язаних цукрів – ксилоза (26,84 мг/г), глюкоза (9,78 мг/г). Інші визначені цукри зустрічаються у значно меншій кількості.

Вперше в результаті проведеного дослідження методом ГХ/МС у траві безсмертника приквіткового було ідентифіковано 26 летких сполук, у квітках – 39. У результаті визначення частки кожної з ідентифікованих речовин у загальній сумі летких сполук були отримані дані, що домінуючими компонентами летких сполук у траві безсмертника приквіткового є: н-гексадеканова кислота (44,48 %), фітол (13,71 %), 9,12-октадеканова кислота (11,21 %) і декаметилтетрасилоксан (8,55 %). У квітках основними леткими сполуками є: н-гексадеканова кислота (48,83 %), 9,12-октадеканова кислота (19,52 %), метиловий естер 7,10,13-гексадекатрієнкової кислоти (8,85 %) і тетрадеканова кислота (6,10 %). Інші ідентифіковані сполуки містяться у значно менших кількостях.

У результаті проведеного дослідження жирних кислот сировини безсмертника приквіткового методом ГХ/МС вперше було ідентифіковано в траві лауринову, лауроолеїнову, пальмітинову, капронову, лінолеву,  $\alpha$ -ліноленову, стеаринову, арахінову, бегенову, лігноцеринову, церотинову кислоти. У квітках вперше було ідентифіковано: лауринову, пальмітинову, лінолеву,  $\alpha$ -ліноленову, стеаринову, арахінову, бегенову, лігноцеринову кислоти. Серед визначених жирних кислот у квітках безсмертника приквіткового знаходяться в значних кількостях: з ненасичених – лінолева (4,10 мг/г) і  $\alpha$ -ліноленова кислота (2,07 мг/г), з насичених – пальмітинова (3,32 мг/г). У траві безсмертника приквіткового серед ідентифікованих жирних кислот у великих кількостях також представлені вищенаведені кислоти, але в інших

кількостях – пальмітинової кислоти міститься (3,61 мг/г), лінолевої (2,85 мг/г),  $\alpha$ -ліноленова кислоти (2,23 мг/г). Інші визначені жирні кислоти зустрічаються значно в меншій кількості.

При дослідженні мінерального складу сировини безсмертника приквіткового вперше було встановлено, що рослина має дуже високий вміст важливих мінералів (мг/100 г): калій: трава – 2670, квітки – 1660, корені – 3880; кальцій: трава – 960, квітки – 310, корені – 1350; магній: трава – 270, квітки – 155, корені – 375; ферум: трава – 23,5, квітки – 7,8, корені – 32,80; натрій: трава – 375, квітки – 310, корені – 450; купрум: трава – 6,4, квітки – 3,6, корені – 6,7.

Під час дослідження екстрактивних речовин, які вилучаються різними екстрагентами, встановлено, що оптимальним екстрагентом є етанол (70% об/об), вміст екстрактивних речовин для трави складає  $26,77 \pm 0,21$  %, для квіток –  $25,00 \pm 0,24$  %. При вивченні динаміки вилучення екстрактивних речовин за послідовними зливами встановлено, що до 5 зливу вилучається більшість екстрактивних речовин та флавоноїдів. Таким чином, для одержання лікарського засобу оптимальним співвідношенням: сировина – готовий екстракт є 1:5.

Для сировини безсмертника приквіткового були визначені технологічні параметри: втрата в масі при висушуванні, середній розмір часток, питома маса сировини, насипна маса сировини до і після усадки, об'ємна густина сировини, коефіцієнт водопоглинання, коефіцієнт поглинання етанолу (70% об/об), пористість сировини, нарізність шару, вільний об'єм шару, загальна зола. Ці параметри є необхідними для створення раціонального технологічного промислового процесу виготовлення безсмертника приквіткового квіток рідкого екстракту та розробки проєктів методів контролю якості (МКЯ) на сировину та безсмертника приквіткового квіток рідкого екстракту.

Для отримання екстракту застосовувався сучасний інноваційний метод вакуумно-фільтраційної екстракції, який дозволяє вилучати екстрактивні речовини, які обумовлюють фармакологічну активність екстракту, а також є досить комерційно привабливим: низька собівартість, незатратний у часі, не потребує високовартісного

обладнання. Також треба зазначити, що цей метод є більш привабливим з точки зору сертифікації НАССР (Hazard Analysis and Critical Control Points, (аналіз ризиків і критичні контрольні точки)). Це сприятиме комерційному майбутньому успіху лікарського засобу «Безсмертника приквіткового квіток рідкий екстракт».

При вивченні антибактеріальних властивостей екстрактів безсмертника приквіткового порівнювали екстракти з трави та квіток безсмертника, які готували в співвідношенні: сировина – готовий екстракт 1:5, при цьому як екстрагент використовували етанол різної концентрації та воду очищену. З порівняння: антимікробна активність залежить від багатьох факторів, зокрема і від виду сировини, екстрагенту та технології отримання.

Вперше було проведено визначення чутливості штамів мікроорганізмів до досліджуваних зразків екстрактів безсмертника приквіткового. Встановлено, що всі досліджувані зразки екстрактів трави і квіток безсмертника приквіткового мають антибактеріальну активність відносно еталонних тест-культур мікроорганізмів: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Proteus vulgaris* ATCC 4636, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Basillus subtilis* ATCC 6633, (діаметр зони затримки росту – від 15,2 до 25,4 мм) та протигрибкову дію по відношенню до референтного штаму *Candida albicans* ATCC 653/885 (діаметр зони затримки росту – від 17,2 до 19,3 мм). Але по відношенню до клінічних штамів антибактеріальна активність більше виражена в етанольних екстрактах трави і квіток відносно *Staphylococcus aureus* (діаметр зони затримки росту 20,7 мм для 70 % етанольного екстракту квіток), *Escherichia coli* (діаметр зони затримки росту 18,3 мм для 70 % етанольного екстракту квіток), *Klebsiella pneumoniae* (діаметр зони затримки росту 17,3 мм для 70 % етанольного екстракту квіток), *Candida albicans* (діаметр зони затримки росту 16,7 мм для 70 % етанольного екстракту трави), *Aspergillus niger* (діаметр зони затримки росту 15,7 мм для етанольного 70 % екстракту квіток). Відносно клінічних штамів *Pseudomonas aeruginosa* антимікробну активність мають тільки 70 % етанольні екстракти квіток і трави (діаметр зони затримки росту 16,2 мм для екстракту

трави і 15,7 мм для екстракту квіток). При цьому, в цілому, антимікробна дія 70 % етанольного екстракту квіток безсмертника приквіткового більш виражена.

Новизна проведених досліджень підтверджена патентом України на корисну модель «Лікарський засіб антимікробної та протигрибкової дії на рослинній основі».

Для дослідження антиоксидантної активності екстракту трави безсмертника приквіткового був застосован хемілюмінесцентний метод (ХМ) з використанням як активатора люмінолу. Цей метод дозволив визначити загальну кількість вільних радикалів, які пов'язує екстракт трави безсмертника приквіткового в досліджуваному зразку та проаналізувати загальну антиоксидантну ємність. Було експериментально встановлено, що екстракт безсмертника приквіткового в ХЛ – системі:  $H_2L_2 - H_2O_2 - Nb$  призводить до зменшення максимальної інтенсивності світіння. Характеристикою антиоксидантної властивості було обрано величину розбавлення, при якій досягається зниження ХЛ на 50 %. Експериментально доведено, що  $I/I_0$  на 50 % досягається при розбавленні екстракту 7,5:1000, що свідчить про високу антиоксидантну властивість безсмертника приквіткового трави екстракту.

Вперше був проведений аналіз морфолого-анатомічної будови сировини безсмертника приквіткового, були визначені анатомічні діагностичні особливості.

Проведені фармакогностичні дослідження та визначення технологічних параметрів сировини і одержаного екстракту, стали підґрунтям для розробки проєктів МКЯ: «Безсмертника приквіткового трава», «Безсмертника приквіткового квітки» та «Безсмертника приквіткового квіток екстракт рідкий».

Результати дослідження особливостей анатомічної будови сировини безсмертника приквіткового впроваджено в науково–дослідну роботу кафедри фармакогнозії та кафедри ботаніки Національного фармацевтичного університету, кафедри фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, кафедри хімії та фармації Ніжинського державного університету імені Миколи Гоголя.

*Ключові слова:* безсмертник приквітковий, трава, квітки, фармакогностичне дослідження, рідкий екстракт, антимікробна та протигрибкова дія, антиоксидантна дія, біологічно активні речовини, методи контролю якості.

*Список публікацій здобувача*

1. Москаленко А. Н., Попова Н. В., Гладух Е. В. Изучение аминокислотного состава сырья бессмертника прицветникового (*Helichrysum bracteatum*). *East European Scientific Journal*. 2018. Vol. 5 (33). P. 49-55. (*Особистий внесок – брав участь у плануванні і проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті*).
2. Москаленко А. М., Попова Н. В. Дослідження мінерального складу сировини безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*). *Український біофармацевтичний журнал*. 2018. № 1(54). С. 72–76. (*Особистий внесок – брав участь у плануванні експерименту, підготовці зразків сировини, узагальненні результатів та написанні статті*).
3. Москаленко А. М., Попова Н. В. Дослідження вуглеводів безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*). *Український біофармацевтичний журнал*. 2018. № 3(56). С. 53–59. (*Особистий внесок – брав участь у плануванні і проведенні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті*).
4. Москаленко А. М., Попова Н. В. Дослідження складу жирних кислот безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*). *Український біофармацевтичний журнал*. 2018. № 4(57). С. 64–68. (*Особистий внесок – брав участь у плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті*).
5. Москаленко А. М., Попова Н. В. Дослідження фенолокарбонових кислот сировини безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*). *Український біофармацевтичний журнал*. 2019. № 3(60). С. 77–82. (*Особистий внесок – брав участь у підготовці зразків сировини, в плануванні і проведенні експерименту, узагальненні результатів та написанні статті*).

6. Москаленко А. М., Попова Н. В. Дослідження органічних кислот сировини безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*). *Український біофармацевтичний журнал*. 2019. № 4(61). С. 65–69. (Особистий внесок – брав участь у плануванні експерименту, підготовці зразків сировини, узагальненні результатів та написанні статті).

7. Москаленко А. М., Попова Н. В. Вивчення летких сполук у сировині безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*). *Український біофармацевтичний журнал*. 2020. № 4(65). С. 70–76. (Особистий внесок – брав участь у плануванні і проведенні дослідження, узагальненні результатів та підготовці статті).

8. Москаленко А. М., Попова Н. В. Особливості анатомічної будови безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*). *Фітотерапія. Часопис*. 2020. № 2. С. 64–74. (Особистий внесок – брав участь у плануванні і проведенні дослідження, узагальненні результатів та підготовці статті).

9. Москаленко А. М., Попова Н. В. Склад флавоноїдів та антибактеріальні властивості екстрактів трави та квіток безсмертника приквіткового. *Norwegian Journal of development of the International Science*. 2021. № 56/2021, Vol.1. Р. 43–49 (Особистий внесок – брав участь у плануванні експерименту, отриманні екстрактів для дослідження, узагальненні результатів та підготовці статті).

10. Фенольні сполуки та антиоксидантна активність безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*) / А. М. Москаленко, Н. В. Попова, М. Є. Блажеєвський, Н. Ю. Бондаренко. *Український біофармацевтичний журнал*. 2019. № 2(59). С. 76–80. (Особистий внесок – брав участь у плануванні експерименту, підготовці зразків сировини, узагальненні результатів та підготовці статті).

11. Москаленко А. М., Попова Н. В. Лікарський засіб антимікробної та протигрибкової дії на рослинній основі: пат. № 145563 Україна. № u 2020 03644; заявл. 18.06.2020; опубл. 28.12.2020, Бюл. № 24 (Особистий внесок – брав участь у патентному пошуку, одержанні лікарського засобу та оформленні патента).



12. Види бессмертника в медицине и фармации / Н. В. Попова, В. И. Литвиненко, Л. А. Бобрицкая, А. Н. Москаленко, Н. Ю. Бондаренко *Застосування методів лікування і аніпрепаратів у медичній, фармацевтичній та косметичній практиці: матеріали всеукраїнської науково-практичної конференції с міжнародною участю*, м. Харків, 29-30 березня 2018 р. Х.: 2018. С. 400–407.

13. Москаленко А.М., Попова Н.В. Дослідження технологічних параметрів сировини безсмертника приквіткового. *Актуальні питання створення нових лікарських засобів: матеріали XXVII Міжнародної науково-практичної конференції молодих вчених та студентів*, м. Харків, НФаУ, 08-10 квітня 2020 р. Харків: НФаУ, 2020. С. 39 – 40.

14. Москаленко А. Н., Попова Н. В., Литвиненко В. И. Исследования фенольных соединений травы бессмертника прицветникового. *Фенольные соединения: свойства, активность, инновации: сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты»*, г. Москва, 14–19 мая 2018 г. / отв. ред. Н.В. Загоскина. Москва: ИФР РАН. 2018. С. 335–339.

15. Moskalenko A.M, Popova N.V. Perspectives of Research of Biological activity of substance of Helichrysum bracteatum. *Topical issues of new drugs developments: abstracts of XXV International Scientific and Practical Conference of young Scientists and students*, Kharkiv, NuPh, 18-20 April 2018 Kharkiv: NuPh, 2018. P. 56.

16. Moskalenko A.M, Popova N.V. Phenol carboxylicacids of the immortelle (Helichrysum bracteatum). *Topical issues of new medicines development: abstracts of XXVI International Scientific and Practical Conference of young Scientists and students*, Kharkiv, NuPh, 10-12 April 2019 Kharkiv: NuPh, 2019. P. 51.

17. Moskalenko A., Popova N. Perspectives of research of Immortelle (Helichrysum bracteatum). *«Scientific and Practical 2018»: 9th International Pharmaceutical Conference*, Kaunas, 09 November 2018. Kaunas, 2018. P. 79.