

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

КОЛІСНИК ЯНА СЕРГІЇВНА

УДК: 615.214.24:582.929.4

**ФАРМАКОГНОСТИЧНЕ ВИВЧЕННЯ ТРАВИ М'ЯТОЧНИКА ЧОРНОГО
ТА СТВОРЕННЯ НА ЇЇ ОСНОВІ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ
ЦЕРЕБРОПРОТЕКТОРНОЇ ДІЇ**

15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія

**Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата фармацевтичних наук**

Харків – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана на кафедрі фармакогнозії
Національного фармацевтичного університету Міністерства охорони здоров'я
України

Науковий керівник: доктор фармацевтичних наук, професор
КОВАЛЬОВА АЛЛА МИХАЙЛІВНА
Національний фармацевтичний університет,
професор кафедри фармакогнозії.

Офіційні опоненти: доктор фармацевтичних наук, старший науковий співробітник
КОТОВ АНДРІЙ ГЕОРГІЙОВИЧ
ДП «Український науковий фармакопейний центр якості
лікарських засобів»; начальник відділу Державної Фармакопеї
України

доктор фармацевтичних наук, професор
МАРЧИШИН СВІТЛАНА МИХАЙЛІВНА
ДВНЗ «Тернопільського державного медичного університету
імені І. Я. Горбачевського, МОЗ України», завідувач кафедри
фармакогнозії з медичною ботанікою

Захист відбудеться «01» квітня 2016 року о 12⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 64.605.01 при Національному фармацевтичному університеті за адресою: 61002, м. Харків, вул. Пушкінська, 53.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Національного фармацевтичного університету (61168, м. Харків, вул. Валентинівська, 4).

Автореферат розісланий « 29 » лютого 2016 року.

Учений секретар
спеціалізованої вченої ради,
професор

В.А. Георгіянц

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Протягом останніх десятиліть захворювання, що пов'язані з порушенням вищих нервових функцій людини, залишаються однією з важливих медико-соціальних проблем більшості країн світу. За даними Всесвітньої організації охорони здоров'я від цереброваскулярних захворювань (ЦВЗ) щорічно у світі потерпає близько 6,7 млн. осіб. В Україні щорічно реєструють понад 100 тис. випадків мозкового інсульту. З людей, що перенесли інсульт до трудової діяльності повертаються близько 18-20 %. Для лікування цереброваскулярних захворювань, у патогенезі яких важливе місце належить гіпоксії, використовують лікарські засоби різних груп: ноотропні, амінокислотні, пептидергічні, ацетилхолінергічні, глутаматергічні, проте при їх застосуванні виникає низка побічних ефектів.

Застосування препаратів рослинного походження у хворих із ЦВЗ є одним з альтернативних методів терапії, що прискорює нормалізацію функцій нервової системи. Отже, пошук та фармакогностичне дослідження лікарської рослинної сировини з церебропротекторною дією та розробка ефективних фітопрепаратів на її основі є актуальним завданням фармації.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Дисертаційна робота виконана відповідно до плану проблемної комісії «Фармація» МОЗ України і є фрагментом комплексних науково-дослідних робіт Національного фармацевтичного університету «Фармакогностичне вивчення біологічно активних речовин, створення лікарських засобів рослинного походження» (номер державної реєстрації 0103U000476) та «Фармакогностичне дослідження лікарської рослинної сировини та розробка фітотерапевтичних засобів на її основі» (номер державної реєстрації 0114U000946).

Мета і задачі дослідження. Метою роботи було системне фармакогностичне дослідження трави м'яточника чорного та створення на її основі нових лікарських засобів.

Для досягнення цієї мети були поставлені такі задачі:

- проаналізувати та узагальнити сучасні дані наукових першоджерел щодо поширення ЦВЗ, фармакологічних властивостей, хімічного складу та ботанічної характеристики трави м'яточника чорного та рослин, які використовують, як церебропротекторні засоби;
- провести попереднє фітохімічне дослідження основних груп біологічно активних речовин (БАР) трави м'яточника чорного, збору та сухого екстракту на його основі;
- ідентифікувати основні групи БАР в об'єктах дослідження, визначити оптимальний склад збору з церебропротекторною дією;
- розробити принципову схему одержання сухого екстракту на основі збору;
- визначити кількісний вміст основних груп БАР у траві м'яточника чорного, зборі та сухому екстракті на його основі;

- провести встановлення основних видів фармакологічної активності одержаного сухого екстракту;
- вивчити основні морфологічні та анатомо-діагностичні ознаки трави м'яточника чорного та компонентів збору;
- розробити проекти методик контролю якості на збір та сухий екстракт на його основі.

Об'єкт дослідження комплексне фармакогностичне вивчення трави м'яточника чорного, збору (трава м'яточника чорного, трава кропиви глухої білої, трава полину австрійського) та сухого екстракту на його основі.

Предмет дослідження: ідентифікація та кількісне визначення БАР у траві м'яточника чорного, зборі та сухому екстракті, стандартизація збору та сухого екстракту на його основі, окремі види фармакологічної активності сухого екстракту.

Методи дослідження: якісний склад БАР сировини та екстрактів визначали фармакопейними методами: тонкошарова хроматографія (ТШХ), паперова хроматографія (ПХ), хромато-мас-спектрометрія (ГХ-МС), високоефективна рідинна хроматографія (ВЕРХ), атомно-абсорбційна спектрометрія (ААС). Кількісний вміст БАР визначали титриметричним та спектрофотометричним методами. Морфолого-анатомічну будову компонентів збору встановлювали за допомогою стереомікроскопу та мікроскопів МБР-1 і МБР-2, знімки мікропрепаратів виконували цифровими фотоапаратами Nikon 5600 та Kodak Easy Share 5. Фармакологічні дослідження проводили *in vivo*.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше проведено фармакогностичне вивчення БАР трави м'яточника чорного, збору та сухого екстракту.

У траві, зборі та сухому екстракті на основі м'яточника чорного встановлено наявність органічних кислот, амінокислот, полісахаридів, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, кумаринів, дубильних речовин, терпеноїдів, каротиноїдів, хлорофілів та стероїдів.

Вперше методом хромато-мас-спектрометрії вивчено якісний склад та кількісний вміст карбонових кислот вегетативних та генеративних органів трави м'яточника чорного. Виявлено та ідентифіковано 18 кислот, серед яких переважають оксалатна, бензойна, яблучна, лимонна, ванілінова, лінолева та ліноленова кислоти.

Вперше методом ВЕРХ у траві м'яточника чорного виявлено 19 речовин фенольної природи, з яких 9 ідентифіковано, серед них фенолкарбонові та гідроксикоричні кислоти: розмаринова, хлорогенова, *n*-кумарова, епігалова. Катехіни: галокатехін, епігалокатехін, епікатехін, катехінгалат, флавіон – апігенін.

Вперше методом хромато-мас-спектрометрії проведено дослідження компонентного складу ефірної олії вегетативних та генеративних органів трави м'яточника чорного. Виявлено та встановлено кількісний вміст 48 речовин. Домінуючими компонентами у вегетативних органах є евгенол (26,3 мг/кг), метилевгенол (39,0 мг/кг), гермакрен *D* (40,2 мг/кг). У генеративних органах

переважають: каріофіленоксид (57,1 мг/кг) та похідні фарнезену (32,2 мг/кг). Спільними є : евгенол, метил евгенол та каріофіленоксид.

Встановлено кількісний вміст органічних кислот, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, танінів та терпеноїдів у траві м'яточника чорного, зборі та сухому екстракті на його основі.

Вперше визначено оптимальний склад збору церебропротекторної дії, до складу якого входять: трава м'яточника чорного, трава кропиви глухої та трава полину австрійського у рівних частинах.

Вперше розроблено принципovu схему одержання сухого екстракту на основі збору та підтверджено його антигіпоксичну активність. Дослідження захищені патентом України на корисну модель № 95238 “Лікарський засіб антигіпоксичної дії”.

Практичне значення одержаних результатів. Розроблено оптимальний склад збору церебропротекторної дії та принципovu схему одержання сухого екстракту на його основі, для яких визначено фармакологічну активність.

Уперше розроблено проекти методик контролю якості на «Збір церебропротекторний» та «Екстракт збору церебропротекторного сухий».

Технологія одержання сухого екстракту зі збору апробована в умовах виробництва ТОВ «ДЗ ДНЦЛЗ».

Результати хімічного та анатомічного дослідження сировини впроваджено в навчальний процес: кафедри фармакогнозії та хімії Південно-Казахстанської державної фармацевтичної академії, кафедри медичної ботаніки і фармакогнозії НФаУ, кафедри фармакогнозії з медичною ботанікою ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України», кафедри фармакогнозії, фармакології і ботаніки Запорізького державного медичного університету, кафедри фармакогнозії і ботаніки Львівського державного медичного університету ім. Данила Галицького, кафедри. Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова.

Особистий внесок здобувача

Безпосередньо автором здійснено:

- інформаційний пошук та аналіз літературних даних за темою дисертації;
- встановлено наявність та визначено кількісний вміст основних груп БАР у траві м'яточника чорного: карбонових кислот, амінокислот, полісахаридів, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, дубильних речовин, терпенів, каротиноїдів, хлорофілів та стероїдів;
- запропоновано склад збору церебропротекторної дії та проведено його стандартизацію;
- розроблено принципovu схему одержання сухого екстракту на його основі;
- визначено кількісний вміст основних груп БАР у зборі та сухому екстракті на його основі;
- розроблено проекти МКЯ на «Збір церебропротекторний» та «Екстракт збору церебропротекторного сухий».

Апробація результатів дисертації

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня: Military and political sciences in the context of social progress. Problems and ways of modern public health development. Materials digest of the XV and XVI International Scientific and Practical Conference (Kiev, London, December 21-December 26, 2011), «Modern medicine and pharmaceuticals: actual problems and prospects of development»: Materials digest of the XXX International Research and Practice Conference and the II Stage of the Championship in medical and pharmaceutical sciences (London, August 16 – August 23, 2012), «Modern medicine and pharmaceuticals: actual problems and prospects of development»: Materials digest of the XXX International Research and Practice Conference and the II Stage of the Championship in medical and pharmaceutical sciences (London, August 16 – August 23, 2012), «Здобутки та перспективи розвитку фармацевтичної та медичної галузі в сучасному світі»: мат. II Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів. (Луганськ, 2012), XIX Российский Национальный Конгресс “Человек и лекарство” (23 – 27 апреля 2012 г, г. Москва, 2012), X Международный симпозиум по химии природных соединений (21 – 23 ноября 2013 г. Ташкент – Бухара, Узбекистан, 2013).

Публікації

За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 15 наукових робіт, у тому числі 7 статей у наукових фахових виданнях, з них 3 закордонні, 7 тез доповідей та 1 патент України.

Обсяг і структура дисертації. Дисертаційна робота викладена на 143 сторінках машинописного тексту, складається зі вступу, огляду літератури, трьох розділів експериментальних досліджень, загальних висновків, додатків, списку використаних джерел літератури. Обсяг основного тексту роботи складає 120 сторінок. Робота ілюстрована 51 рисунком та 27 таблицями. Список використаних джерел літератури має 155 найменувань, серед яких 93 кирилицею та 62 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ 1. Ботанічна характеристика, хімічний склад та застосування у медицині лікарської рослинної сировини, яку використовують у терапії цереброваскулярних захворювань – наведено дані наукових першоджерел – відомості про захворювання, пов'язанні з порушенням вищих нервових функцій людини, що залишаються однією з найважливіших медико-соціальних проблем більшості країн світу. Проведений нами критичний огляд наукових першоджерел стосовно сучасного стану фітотерапії цереброваскулярних захворювань показав перспективність дослідження м'яточника чорного та фітозборів на його основі.

Розділ 2. Хімічний скринінг біологічно активних речовин у траві м'яточника чорного, зборі та сухому екстракті на його основі. Наведено результати досліджень різних серій сировини, що вивчали, реактиви, прибори, методи, методики, використані в дослідженнях. Об'єктами для дослідження стали трава м'яточника

чорного (*Ballota nigra* L.), та збір на її основі, до складу якого входять: трава м'яточника чорного (*Ballota nigra* L.), глухої кропиви білої (*Lamium album* L.) та трава видів роду Полин (*Artemisia* L.).

У траві м'яточника чорного, зборі та його компонентах за допомогою хімічних та фізико-хімічних методів були ідентифіковані такі групи БАР як: вільні та зв'язані цукри, водорозчинні полісахариди, амінокислоти, органічні кислоти, в тому числі фенолкарбонів та гідроксикоричні, флавоноїди, дубильні речовини, терпеноїди, стероїдні сполуки, каротиноїди та хлорофіли.

Розділ 3. Кількісне визначення основних груп біологічно активних речовин у траві м'яточника чорного, зборі та сухому екстракті на його основі. У розділі представлені результати вивчення якісного складу та кількісного вмісту основних груп БАР в сировині, зборі та субстанції.

Для обґрунтування співвідношення компонентів збору нами проведено аналіз як наукових першоджерел, так і власних експериментальних досліджень. До складу збору нами введено рослинні компоненти, що містять різні комплекси БАР, які проявляють протизапальну, гіпохолестеринемічну, антиоксидантну, спазмолітичну, антитоксичну, седативну та антибактеріальну активність, а саме: траву м'яточника чорного, траву глухої кропиви білої та траву полину австрійського. Сумісна присутність цих видів сировини призводить до потенціювання фармакологічної дії за рахунок того, що компоненти збору мають різний механізм дії і підвищують рівень передбачуваного лікувального ефекту, і саме така полівалентність дії збору знижує можливість побічних проявів.

Нами проведено обґрунтування введення трави видів родів Полин та Глуха кропиви, які найбільш поширені у флорі України та застосовуються у народній чи офіційній медицині як ноотропні та церебропротекторні засоби. Проаналізувавши проведені нами дослідження та дані попередніх досліджень вчених НФаУ щодо хімічного складу ЛРС різних видів полину та з урахуванням поширення в українській флорі видів роду Полин нами було обрано полин австрійський.

Хімічний склад трави глухої кропиви білої – наявність терпеноїдів, амінокислот, фенолкарбонів та гідроксикоричних кислот за нашою думкою може зумовити ноотропний ефект.

Методом хромато-мас-спектрометрії проведено визначення якісного складу та кількісного вмісту карбонів кислот вегетативних (листя, стебла) та генеративних (квітки: чашечки, оцвітину) органів трави м'яточника чорного (рис. 1). Попередньо кислоти були переведені у відповідні метилові естери. За результатами хроматографічного дослідження у траві м'яточника чорного було виявлено 34 органічні кислоти, в тому числі 27 аліфатичних та 7 ароматичних.

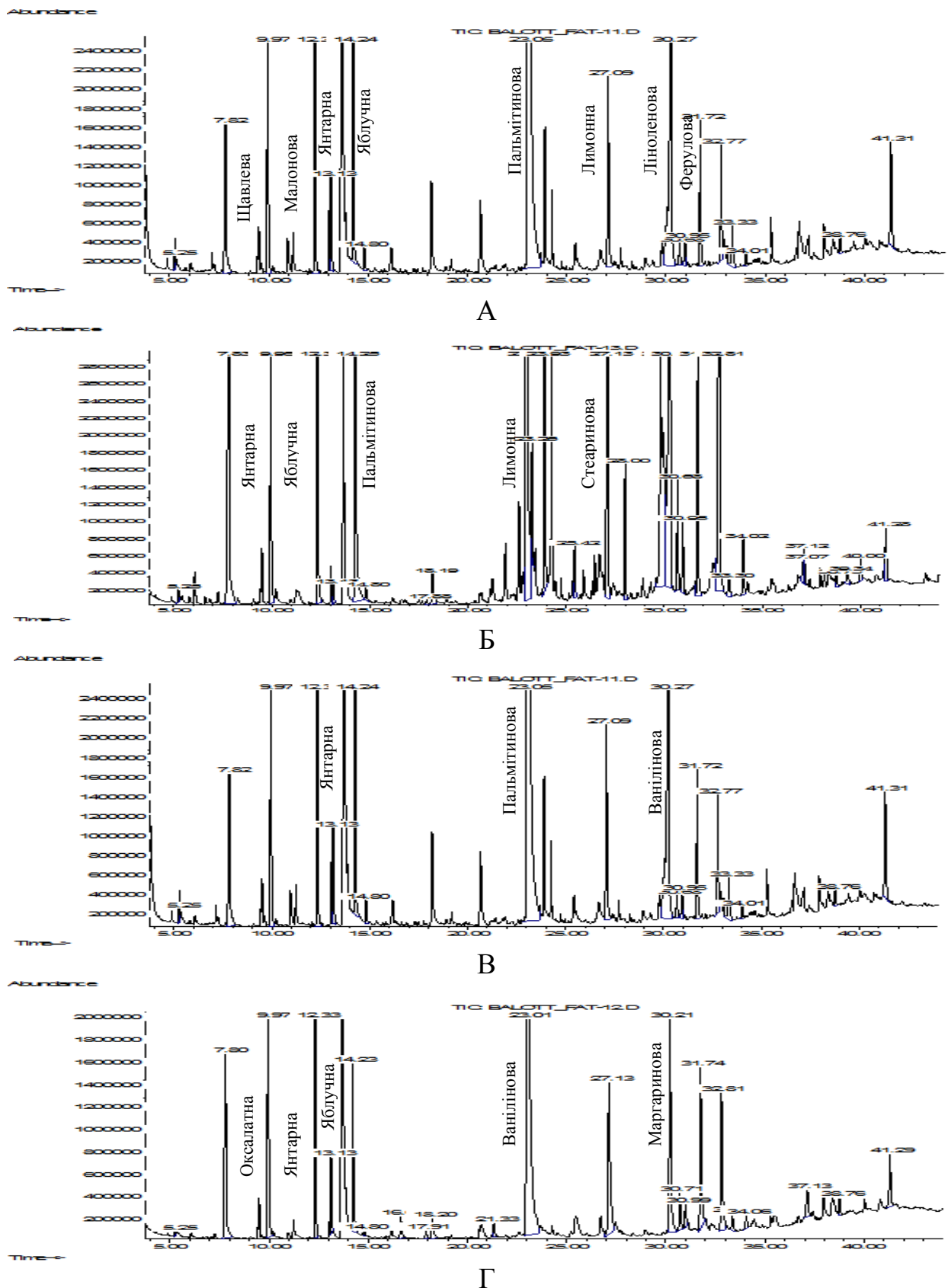


Рис. 1 Хроматографічний профіль метилових естерів карбонових кислот м'ятючника чорного: А – трави; Б – листя; В – стебел, Г – віночків квіток

Серед аліфатичних кислот виявлено 14 жирних кислот, у тому числі 9 насичених (капронова, пентадеканова, пальмітинова, маргарінова, стеаринова, арахінова, бегенова, трикозанова, тетракозанова), 3 мононенасичених (пальмітолеїнова, олеїнова, гадолеїнова кислоти), 2 поліненасичені (лінолева та ліноленова) кислоти.

У результаті у траві ідентифіковано 9 аліфатичних дикарбонових кислот: оксалатна, малонова, бурштинова, глутарова, азелаїнова, фумарова, яблучна, 3-гідрокси-2-метилглутарова, 2-оксо-глутарова і 3 трикарбонових – 2 ізомери 1,1,2-етан-трикарбонових кислот і лимонна кислоти.

Серед ароматичних кислот ідентифіковано та встановлено вміст таких кислот, як бензойна, фенолкарбонові кислоти – саліцилова, ванілінова, бузкова та гентизинова, гідроксикоричні – *n*-кумарова і ферулова кислоти (табл.1).

Таблиця 1

Ароматичні кислоти м'яточника чорного

Кислоти	Вміст кислот в сировині, мг/кг				
	Трава	Стебла	Листя	Квітки	
				Чашечки	Віночки
Бензойна	83,7	88,6	72,3	43,6	27,0
Саліцилова	98,4		245,1	339,8	201,3
Ванілінова	212,5	223,5	157,8	159,7	
Бузкова	68,2	60,1	80,1	62,8	107,1
Гентизинова	33,5		100,7		
<i>n</i> -Кумарова	35,1		105,3		299,8
Ферулова	493,9	557,8	348,9	301,7	445,4

У листі м'яточника чорного було ідентифіковано 20 аліфатичних кислот, превалюючими за вмістом серед них є (мг/кг): лимонна (10784,5), ізомери 1,1,2-етан-трикарбонових (загальний вміст 7561,6), ліноленова (5009,7), яблучна (4759,4) і пальмітинова (3903,0). У листі визначено 8 ароматичних кислот, серед яких домінують (мг/кг): ферулова (348,9) і саліцилова (245,1) кислоти.

Слід зазначити, що тільки в листі було виявлено гентизинову та 2-оксо-глутарову кислоти. Характерними для листя є високий вміст ізомерів 1,1,2-етан-трикарбонових кислот.

У стеблах м'яточника чорного визначено 13 аліфатичних кислот, домінуючими серед них є (мг/кг): яблучна (7140,1) і лимонна кислоти (5782,2); визначено також 5 ароматичних кислот, серед яких переважають ферулова (557,8) і ванілінова (223,5).

У віночках квіток м'яточника визначено 15 аліфатичних кислот зі значним вмістом яблучної (11381,6 мг/кг). Встановлено, що віночки містять 7 ароматичних кислот з високим вмістом (мг/кг): ферулової, *n*-кумарової і саліцилової кислот – 445,0, 299,8 і 201,3 відповідно.

У результаті дослідження чашечок квіток визначено 24 аліфатичних кислот, серед них переважають (мг/кг): оксалатна (4385,7), яблучна (4289,2) і пальмітинова (3359,2) кислоти, у тому числі 6 ароматичних кислот, серед яких домінують саліцилова (339,8) і ферулова (301,7).

Характерними для чашечок м'яточника чорного були пентадеканова, маргарінова і трикозанова кислоти.

Для генеративних органів специфічними є глутарова і 3-гідрокси-2-метилглутарова кислоти.

У результаті дослідження фенольних сполук трави м'яточника чорного методом ВЕРХ виявлено 19 речовин (рис. 2), 9 з яких ідентифіковано – це фенолкарбонові та гідроксикоричні кислоти: розмаринова, епігалова, *n*-кумарова, хлорогенова кислоти; катехіни – галокатехін, епікатехін, епігалокатехін, катехінгалат; флавіон – апігенін.

У сировині м'яточника чорного спостерігається високий вміст (мг/кг): хлорогенової (890,00), розмаринової (861,00) кислот, галокатехіну (2458,00) та епігалокатехіну (2929,00).

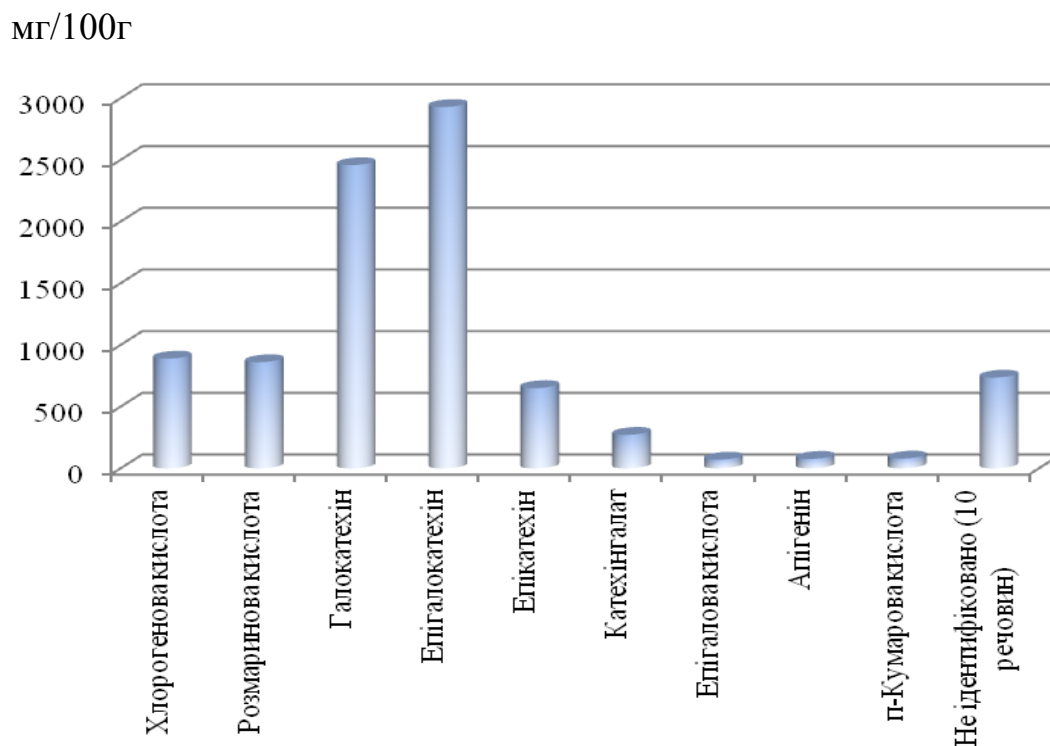


Рис. 2 Вміст фенольних сполук у траві м'яточника чорного, визначених методом ВЕРХ

Визначено якісний склад та кількісний вміст макро- і мікроелементів методом атомно-абсорбційної спектрометрії у траві м'яточника чорного та зборі: ідентифіковано та визначено вміст 5 макро – К, Са, Р, Mg, Si та 10 мікроелементів – Al, Cu, Fe, Mn, Mo, Na, Ni, Zn, Sr, Pb. Відмічається значний вміст макроелементів (мг/кг): калію – у траві 4530, у зборі – 3840; кальцію – у траві 1200, у зборі – 1025; магнію – у траві 385, у зборі – 600.

Встановлено, що сировина відповідає вимогам ДФУ щодо вмісту важких металів, які знаходяться у дозволених межах вимог гранично допустимих концентрацій для сировини використовуються у фармації.

В результаті дослідження компонентного складу ефірної олії вегетативних та генеративних органів трави м'яточника чорного (методом хромато-мас-спектрометрії) виявлено та встановлено кількісний вміст 48 речовин (табл. 2, рис. 3). Домінуючими компонентами у вегетативних органах є евгенол (26,3 мг/кг), метилевгенол (39,0 мг/кг), гермакрен *D* (40,2 мг/кг). У генеративних органах переважають: каріофіленоксид (57,1 мг/кг) та похідні фарнезену (32,2 мг/кг).

Таблиця 2

Компонентний склад ефірних олій вегетативних та генеративних органів трави м'яточника чорного

Сполука	Кількісний вміст сполуки у, мг/кг				
	віночки	чашечки	листя	стебла	трава
1	2	3	4	5	6
Бензальдегід	3,9	–	–	5,1	3,2
1-Октен-3-ол	3,5	–	–	10,4	6,5
2,3,5-Триметилпіразин	–	–	–	7,9	5,0
Октаналь	–	10,9	–	–	0,5
Фенілацетальдегід	9,3	–	31,3	–	10,1
Бензиловий спирт	–	–	–	9,8	6,5
Лимонен	–	10,3	–	–	0,3
Тетраметилпіразин	–	–	–	26,5	15,1
2,5-Диметил-3-ацетилфуран	5,1	–	–	–	0,1
Нонаналь	–	21,5	–	–	0,6
Ліналоол	4,9	–	–	–	0,1
2,2,6-Триметил-4-метилен-2Н-піран	172,3	–	14,9	42,5	32,2
Вербенол	–	–	–	7,1	6,0
Метилсаліцилат	4,6	–	–	313	202,4
α -Терпінеол	4	–	–	6,2	4,0
Вербенон	–	–	35,7	3,2	13,7
Деканаль	8,9	71	27,1	–	8,2
Етилсаліцилат	–	–	–	7,6	4,8
4-Вініл-2-метоксифенол	–	–	–	36,1	22,1
Додеканаль	–	519	–	–	15,2
Евгенол	26,3	–	12,2	18,9	16,0
Капринова кислота	39	–	–	–	0,8
Метилевгенол	26,3	39,6	12,8	–	4,6

1	2	3	4	5	6
β -Каріофілен	26,8	–	–	2	0,2
Геранілацетон	8,6	10,9	12,5	3,8	7,6
Гумулен	11,3	–	–	2,2	1,6
β -Іонон-епоксид	–	–	36,4	5,4	15,2
β -Іонон	–	–	–	3,3	2,2
Гермакрен D	40,2	–	–	8,2	5,5
Дигідроактинідіолід	–	–	43,8	–	14,6
Пентадекан	–	53,9	–	–	1,5
Елеміцин	–	14	–	–	0,5
Елемол	18,5	–	–	–	0,4
Каріофіленоксид	57,1	–	–	6,8	6,0
Лауринова кислота	–	67,1	–	–	2,1
Бензофенон	–	11,7	–	–	0,4
Транс-Ізоелеміцин	–	67,1	–	–	2,0
11-Тетрадеценова кислота	–	–	–	4,9	3,0
Міристинова кислота	100,6	271,3	187,5	41,9	88,6
Фарнезол	–	–	32,2	–	21,1
Гексагідрофарнезилацетон	167,4	60,3	–	–	11,4
Пентадеканова кислота	50,7	182,1	121,8	–	45,1
Фарнезилацетон	–	–	68,8	–	21,4
Пальмітолеїнова кислота	44,5	306,4	196,9	34,7	107,2
Пальмітинова кислота	573,9	1620,6	656,5	130,9	300,6

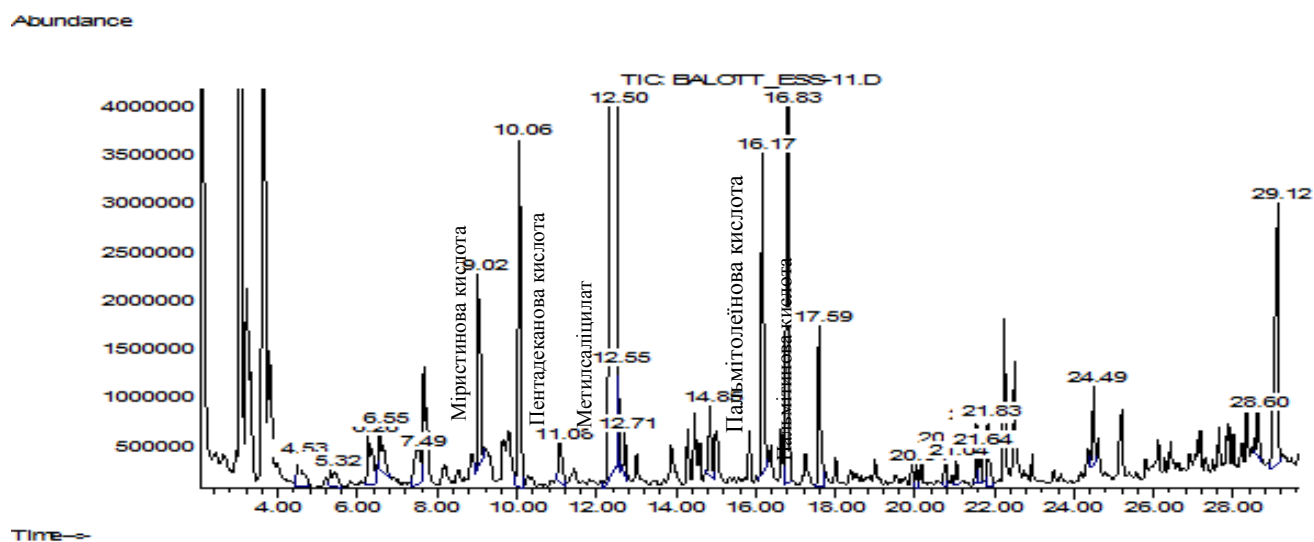


Рис. 3 Хроматографічний профіль компонентного складу ефірної олії трави м'яточника чорного

Розділ 4. Стандартизація сировини та збору на основі трави м'яточника чорного та сухого екстракту на його основі; дослідження фармакологічної активності екстракту. При дослідженні співвідношення органів у траві встановлено, що у сировині маса стебл становить 65 %, листя – 27 % та квіток 7 %. Вивчено морфолого-анатомічну будову трави м'яточника чорного. Виокремлено морфологічні ознаки, що мають діагностичне значення – це ребристість стебел, листкорозміщення, колір, та антоціанове забарвлення стебел, головчастих залозки листка та краї листкових пластинок. Анатомічні діагностичні ознаки квітки представлено на рис. 4.

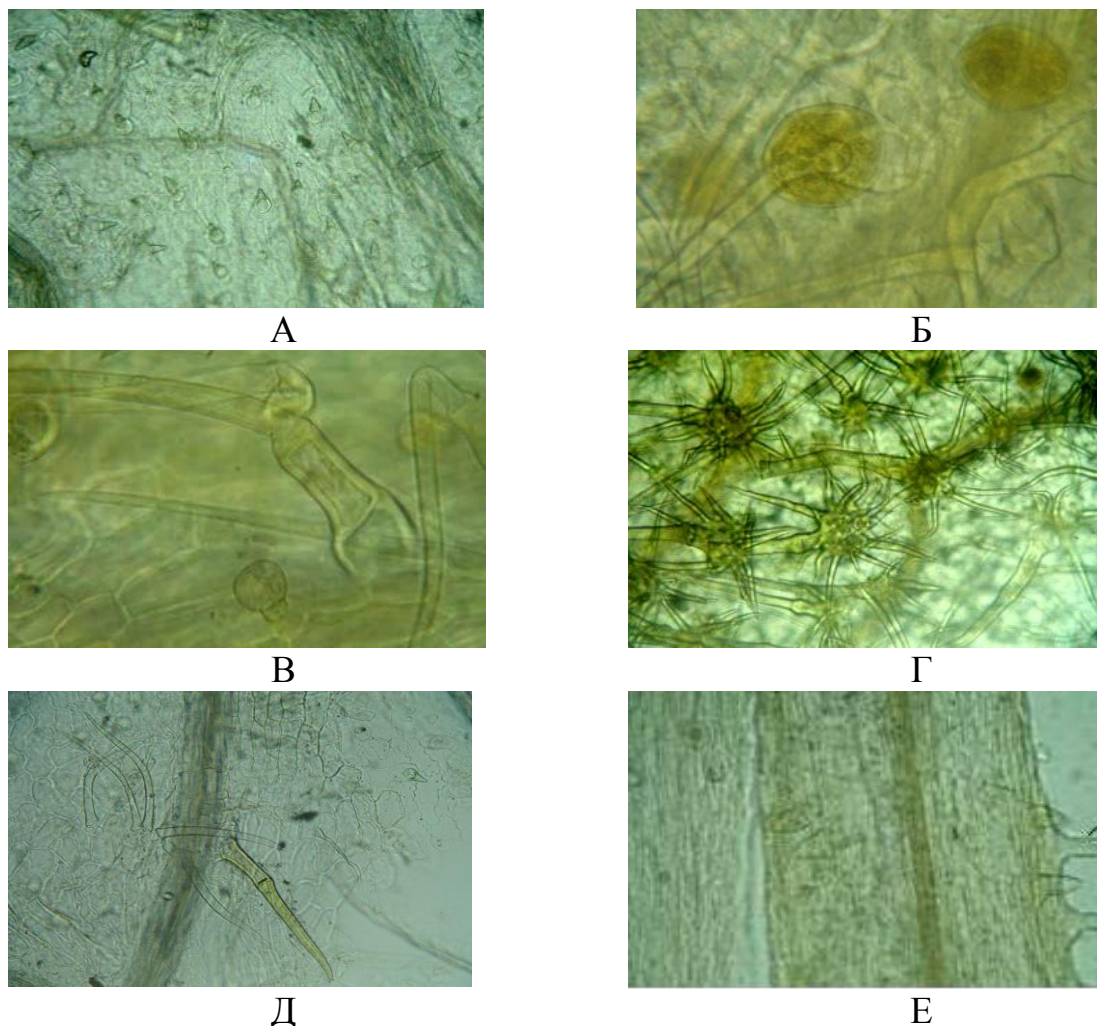


Рис. 4 Діагностичні ознаки анатомічної будови квітки м'яточника чорного: А – внутрішня епідерма чашечки квітки; Б – ефіроолійні залозки на епідермі оцвітини квітки; В – прості суглобоподібні волоски; Г – дендроподібні волоски; Д – прості двоклітинні волоски; Е – одноклітинні волоски з ніжно-бородавчастою кутикулою

Листкова пластинка гіпостоматична, продиховий апарат діацитного типу. Наявність та розміщення опушення: виявлено 4 типи волосків: прості волоски 2 – 3-клітинні, товстостінні з бородавчастою кутикулою; головчасті волоски з одноклітинною ніжкою і 4-х клітинною головою; прості одноклітинні волоски з ніжно бородавчастою кутикулою; дендроподібні волоски з центральним довгим дво-

триклітинним волоском з цибулеподібною основою і бородавчастою поверхнею та з п'ятьма, десятьма та п'ятнадцятьма одноклітинними короткими тонкими волосками, що відгалужуються від загальної основи. Ефіроолійні залозки мають 6 – 8 – клітинну головку. Отримані результати використано для розробки відповідних розділів проекту Методик контролю якості «М'яточника трава».

Для проведення досліджень було одержано 5 серій збору, опрацьовані параметри стандартизації та проведено :-. аналізи відповідно до розробленого проекту МКЯ, встановлено мікроскопічні ознаки, визначено хроматографічним профіль, проведено контроль вмісту сторонніх домішок, визначено втрату в масі при висушуванні, проведено визначення загальної золи, золи нерозчинної у кислоті хлоридній; проведено визначення кількісним визначенням вмісту суми гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту (не менше 3 %).

Макроскопічними ознаками збору є певні елементи, які характерні для м'яточника чорного, кропиви глухої білої та полину австрійського. Запропоновано контролювати якість збору за описом, що характеризує усі компоненти збору: квітки з лінійно-шиловидними приквітками, двостатеві, неправильні, в пазушних півзонтиках, що утворюють несправжні кільця, які зближені на верхівках головного та бічних пагонів; віночок бруднувато-рожевий, зрідка білий, волосистий, з трубочкою, не довшою за чашечку, двогубий; верхня губа довгаста, трохи шоломоподібна, дволопатева, виїмчаста, нижня – трилопатева, з великою, обернено-серцеподібною лопаттю; (м'яточник чорний) чашечка з 10 жилками, зубці її ланцетні, відтягнуто-загострені, відстовбурчені, з жорстким вістряем, у 2-2,5 рази коротші за трубочку; стебло чотиригранне, м'яко опушене. листки супротивні. Квітки зигоморфні, білі або блідо-жовті в густих кільцях (глуха кропива біла). Квітки у напівкулястих або яйцеподібних кошиках, відхилених або пониклих, на довгих квітконіжках, у агрегатному китицеподібному суцвітті; листочки обгортки волосисті, крайових квіток звичайно 5-7, віночок дуже маленький, майже ниткоподібний, до основи розширений (полин австрійський).

Мікроскопічні ознаки збору. Т-подібні волоски з 2-3 клітинною ніжкою, прості, довгі, тонкостінні, дуже звивисті (полин австрійський); внутрішня епідерма пелюстки квітки: дендроподібні волоски, які мають центральний довгий великий дво-, триклітинний волосок з цибулеподібною основою і бородавчастою поверхнею, та п'ять, десять або п'ятнадцять одноклітинних коротких волосків, що відгалужуються від загальної основи; прості 2-3-клітинні волоски з бородавчастою поверхнею зі суглобоподібним зчленуванням клітин (м'яточник чорний), головчасті волоски з багатоклітинною ніжкою (3-клітинна ніжка) і 2-4 клітинною голівкою (глуха кропива біла). Також зустрічаються фрагменти епідерми стебла з прямостінними клітинами. Фрагменти пластинки листків з ефіроолійними залозками, які характерні для родини глухокропивні та айстрові; листові пластинки з жилками, розташованими вздовж листка.

Розроблено принципову схему одержання сухого екстракту зі збору, спосіб якого захищено патентом. На збір, до складу якого входять трава м'яточника чорного, трава

кропиви глухої та трава полину австрійського у рівних кількостях, та сухий екстракт на його основі було розроблено проекти МКЯ та на сухий екстракт проведено аналіз 5 серій одержаних екстрактів.

Стандартизацію сухого екстракту на основі збору запропоновано проводити за описом; хроматографічним профілем; визначенням втрати маси при висушуванні; визначенням загальної золи та золи, нерозчинної у кислоті хлоридній; контролем за мікробіологічною чистотою, а також за визначенням кількісного вмісту визначення флавоноїдів у перерахунку на рутин – не менш 0,5 % та суми гідроксикоричних кислот у перерахунку на хлорогенову кислоту – не менш 10 %.

Всі серії збору та сухих екстрактів відповідали критеріям розроблених проектів МКЯ.

Фармакологічні дослідження проводили на кафедрі фармакології НФаУ під керівництвом професора С. Ю. Штриголя. Досліджено вплив на поведінку тварин у тесті відкритого поля та антигіпоксичну активність сухого екстракту на основі збору, до складу якого входять трава м'яточника чорного, трава кропиви глухої білої та трава полину австрійського у рівних кількостях. При застосуванні екстракту в дозі 200 мг/кг змінювалась поведінка тварин таким чином: достовірно у порівнянні з контролем підвищувалась орієнтовно-дослідницька активність на рівні препарату порівняння пірацетаму без суттєвого впливу на локомоторну активність. Результати тесту відкритого поля свідчать про наявність вираженого седативного ефекту сухого екстракту в дозі 400 мг/кг. Ці результати свідчать про дозозалежний характер впливу досліджуваного сухого екстракту на поведінкові реакції: у меншій дозі виявляється стимуляція орієнтовно-дослідницьких реакцій, зі збільшенням дози – седативна дія. Застосування сухого екстракту у дозі 400 мг/кг збільшує час життя мишей у порівнянні з контролем більш ніж у півтори рази, перевершуючи референт-препарат пірацетам. Отже, сухий екстракт на основі збору виявляє седативну та антигіпоксичну активність, що свідчить про його церебропротекторну дію.

Дослідження гострої токсичності показано, що одержаний екстракт відноситься до класу практично нетоксичних речовин при внутрішньошлунковому введенні ($LD_{50} > 5000$ мк/кг).

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено узагальнення даних та вирішення наукової задачі, яка полягає у системному вивченні трави м'яточника чорного та створенні на її основі нових лікарських засобів з церебропротекторною дією, дослідженні основних груп біологічно активних речовин, розробці та стандартизації лікарських засобів на їх основі.

1. Попереднє фітохімічне дослідження основних груп БАР у траві м'яточника чорного, збору та його компонентів показали наявність таких груп БАР, як органічні кислоти, амінокислоти, полісахариди, гідроксикоричні кислоти, флавоноїди, кумарини, дубильні речовини, терпени, каротиноїди, хлорофіли та стероїди

2. Вперше методом хромато-мас-спектрометрії проведено вивчення карбонових кислот вегетативних та генеративних органів м'яточника чорного. Ідентифіковано та визначено вміст 18 кислот, серед яких переважають у вегетативних органах: оксалатна (3094,9 мг/кг), бензойна (88,6 мг/кг), яблучна (2490,6 мг/кг), ванілінова (157,8 мг/кг), лінолева (1659,7 мг/кг) та ліноленова (5009,7 мг/кг) кислоти; а у генеративних органах високий вміст спостерігався лимонної (2799,38 мг/кг) і пальмітинової (3359,2 мг/кг) кислот. Серед ароматичних кислот ідентифіковано бензойну (88,6 мг/кг), з фенолкарбонових – саліцилову (245,1 мг/кг), ванілінову (223,5 мг/кг), сиреневу (107,1 мг/кг) та гентизинову (100,7 мг/кг), з гідроксикоричних – *n*-кумарову (299,8 мг/кг) і ферулова (557,8 мг/кг), а також встановлено їх вміст.

3. Обґрунтовано оптимальний склад збору церебропротекторної дії на основі трави м'яточника чорного, до складу якого входять трава кропиви глухої білої та трава полину австрійського у рівних частинах. Розроблено принципову схему одержання сухого екстракту на основі збору, пріоритет якої захищений патентом України на корисну модель № 95238 “Лікарський засіб антигіпоксичної дії”.

4. Встановлено кількісний вміст органічних кислот, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів, танінів та терпенів у траві м'яточника чорного.

5. Вперше методом ВЕРХ у траві м'яточника чорного виявлено 19 речовин, з яких 9 ідентифіковано та встановлено вміст: фенолкарбонові та гідроксикоричні кислоти – розмаринова (861,00 мг/100г), епігалова (71,00 мг/100г), *n*-кумарова (80,00 мг/100г), хлорогенова (890,00 мг/100г); катехіни – галокатехін (659,00 мг/100г), епікатехін (мг/100г), епігалокатехін (2929,00 мг/100г), катехінгалат (272,00 мг/100г); флавіон – апігенін.

6. Вперше методом хромато-мас-спектрометрії визначено компонентний склад ефірної олії вегетативних та генеративних органів м'яточника чорного. Ідентифіковано та встановлено вміст 48 речовин. Домінуючими компонентами у вегетативних органах є евгенол (26,3 мг/кг), метилевгенол (39,0 мг/кг), гермакрен D (40,2 мг/кг), у генеративних органах – каріофіленоксид (57,1 мг/кг) та похідні фарнезену (32,2 мг/кг).

7. У результаті фармакологічного дослідження встановлено, що сухий екстракт збору виявляє седативну та антигіпоксичну активність, що свідчить про його церебропротекторну дію. Дослідження гострої токсичності показало, що одержаний екстракт відноситься до класу практично нетоксичних речовин при внутрішньошлунковому введенні ($LD_{50} > 5000$ мкг/кг).

8. Визначено основні діагностичні морфолого-анатомічні ознаки трави м'яточника чорного, компонентів збору, до складу якого вона входить. Для трави м'яточника чорного основними діагностичними ознаками є: тип та розміщення трихом, а для компонентів збору морфологічні особливості квіток складових та характерне опушення. Розроблено проекти МКЯ «Збір церебропротекторний» та «Екстракт збору церебропротекторного сухий».

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Дослідження компонентного складу ефірної олії квіток *Lamium album* / А. М. Ковальова, Я. С. Колісник, О. В. Гончаров, Т. В. Ільїна // Запорожский медицинский журнал. – 2012. – №3. – С. 74-75. (Дисертант брав участь в пробопідготовці експерименту, оформленні статті та формулюванні висновків).
2. The research of antibacterial activity of tarragon and other species of the genus *Artemisia* L. / A. Kovaleva, O. Ochkur, N. Kashpur, Ya. Kolesnik // The pharma innovation. – 2013. – V. 2, N 9. – P.48-50. (Дисертант брав участь у підготовці зразків та оформленні статті).
3. Ochkur A.V. Amino-acid composition of subgenus *Artemisia* Herbs / A. V. Ochkur, A. M. Kovaleva, Ya. S. Kolesnik // Chemistry of Natural Compounds. – 2013. – V. 49, N 3. – P. 589-591. (Дисертант брав участь в пробопідготовці та написанні статті із визначенням висновків).
4. Kolisnyk Ya.S. The study of the volatile oils composition obtained from vegetative and generative organs of *Ballota nigra* L. / Ya. S. Kolisnyk, A. M. Kovaleva, O. V. Goryacha // Вісник фармації. – 2014. – №2. – С.59-62. (Дисертант заготовив сировину з різних регіонів, брав участь у пробопідготовці та проведенні експерименту, оформленні результатів досліджень).
5. Колесник, Я. С. Фенольные соединения жидкого экстракта травы белокудренника черного (*Ballota nigra* L.) / Я. С. Колесник, А. В. Очкур, А. М. Ковалева // Вестник ЮКГФА. – 2014. – № 3 (68), Т. 4. – С. 50-52. (Дисертант сформулював мету роботи, проаналізував отримані результати, займався пробопідготовкою, брав участь в оформленні статті та формулюванні висновків).
6. Дослідження хімічного складу, впливу на поведінкові реакції та антигіпоксичної активності фітозбору та сухого екстракту на його основі / Я. С. Колісник, Т. В. Упир, О. М. Кошовий, С. Ю. Штриголь, А. М. Ковальова // Вісник Фармації. – № 4. – 2014. – С. С. 79-82. (Дисертант брав участь у підготовці зразків, проведенні експерименту та написанні статті із визначенням висновків).
7. Organic acid of vegetative and generative organs of black horehound / Ya. Kolisnuk, O. Ochkur, A. Kovalyova, O. Koshoviy // The Pharma Innovation – 2014. – P. 33-37. (Дисертант провів заготівлю сировини та пробопідготовку, сформулював мету роботи, приймав участь в оформленні статті та формулюванні висновків).
8. Патент України на корисну модель № 95238, МПК А61К 36/00. Лікарський засіб антигіпоксичної дії / Я.С. Колісник, А.М. Ковальова // Опубл. 10.12.2014, бюл. № 23/2014; заяв. № u201408081 від 17.07.2014. (Дисертант провів заготівлю сировини, брав участь у плануванні та проведенні експерименту, приймав участь у написанні та оформленні патенту).
9. Антибактеріальна активність ліпофільних екстрактів трави *Artemisia abrotanum* L. / А. М. Ковальова, А. В. Очкур, Я. С. Колесник, Н. В. Кашпур // Military and political sciences in the context of social progress. Problems and ways of modern public health development. Materials digest of the XV and XVI International Scientific and Practical

Conference (Kiev, London, December 21-December 26, 2011). – Odessa: InPress, 2012. – С. 180-181.

10. Колісник Я.С. Дослідження компонентного складу ефірної олії листа *Lamium album* / Я.С. Колісник, А.М. Ковальова, Т.В. Ільїна // «Modern medicine and pharmaceuticals: actual problems and prospects of development»: Materials digest of the XXX International Research and Practice Conference and the II Stage of the Championship in medical and pharmaceutical sciences. (London, August 16– August 23, 2012) – 2012. – P.113-115.

11. Органические кислоты экстрактов травы полыни песчаной (*Artemisia arenaria* DC.) / Очкур А.В., Чуксина А.Н., Ковалева А.М., Колесник Я.С. // «Modern medicine and pharmaceuticals: actual problems and prospects of development»: Materials digest of the XXX International Research and Practice Conference and the II Stage of the Championship in medical and pharmaceutical sciences. (London, August 16 – August 23, 2012) – С. 116-117.

12. Порівняльний склад ефірної олії кропиви глухої білої у процесі зберігання / Я.С. Колісник, О.В. Гончаров, О.В. Очкур // Здобутки та перспективи розвитку фармацевтичної та медичної галузі в сучасному світі: мат. II Всеукр. наук.-практ. конф. молодих вчених та студентів. – Луганськ: ЧП «Континенталь», 2012. – С. 94-95.

13. Фитохимическое и микробиологическое исследование видов рода полынь флоры Украины / А.В. Очкур, А.М. Ковалева, Н.В. Кашпур, Я.Г. Коваленко, Я.С. Колесник // XIX Российский Национальный Конгресс “Человек и лекарство”. Сб. материалов Конгресса (Тезисы докладов). – 23-27 апреля 2012 г. – М., 2012. – С. 409.

14. Research of fatty acid composition of *Artemisia annua* L., *Artemisia abrotanum* L. and *Artemisia dracunculus* L. herbs / A.V. Ochkur, A.M. Kovalyova, J.S. Kolesnik // X Международный симпозиум по химии природных соединений, 21-23 ноября 2013 г. Ташкент-Бухара, Узбекистан. – Ташкент, 2013. – P. 285

15. Колісник Я.С. Перспективи створення рослинного збору з церебропротекторною активністю / Я.С. Колісник, А.М. Ковальова // Актуальні питання створення нових лікарських засобів: матер. 43 Всеукр. наук.-практ. конф. студ. та мол. вчених (19-20 квітня 2012 р.). – Х.: НФаУ, 2012. – стор. 75. – 724 с.

Колісник Я.С. Фармакогностичне вивчення трави м'яточника чорного та створення на її основі лікарських засобів церебропротекторної дії – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата фармацевтичних наук за спеціальністю 15.00.02 – фармацевтична хімія та фармакогнозія. – Національний фармацевтичний університет МОЗ України, Харків, 2016.

Дисертаційну роботу присвячено системному вивченню трави м'яточника чорного та створенню на її основі нових лікарських засобів з церебропротекторною дією. Досліджено основні групи біологічно активних речовин сировини м'яточника чорного, розробленого збору і одержаного екстракту на його основі. Встановлено компонентний склад і визначено кількісний вміст 18 ди- та трикарбонових, жирних, ароматичних кислот. У сировині та зборі визначено 19 макро- та мікроелементів. Визначено компонентний склад ефірної олії вегетативних та генеративних органів

м'яточника чорного: ідентифіковано та визначено вміст 48 сполук. У сировині та зборі визначено кількісний вміст суми фенольних сполук, гідроксикоричних кислот, флавоноїдів. Встановлено морфолого-анатомічні ознаки вегетативних та генеративних органів м'яточника чорного. Проведено стандартизацію сировини та збору. Розроблено проекти МКЯ на «Збір церебропротекторний» та «Екстракт збору церебропротекторного сухий». Виявлено церебропротекторну – седативну та антигіпоксичну активність екстракту на основі збору.

Ключові слова: м'яточник чорний, трава, листя, стебла, квітки, фармакогностичне дослідження, біологічно активні речовини, збір, седативна, антигіпоксична активність.

Колесник Я. С. Фармакогностическое изучение травы белокудренника черного и создание на ее основе лекарственных средств церебропротекторного действия – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 15.00.02 – фармацевтическая химия и фармакогнозия. – Национальный фармацевтический университет МЗ Украины, Харьков, 2016.

Диссертационная работа посвящена системному изучению травы белокудренника черного для создания на ее основе новых лекарственных средств с церебропротекторным действием, исследованию основных групп биологически активных веществ, разработке и стандартизации лекарственных средств на их основе.

Установлено количественное содержание органических кислот, гидроксикоричных кислот, флавоноидов, танинов и терпенов в траве белокудренника черного.

Впервые определено количественное содержание карбоновых кислот в различных органах белокудренника черного; идентифицировано 18 карбоновых кислот, среди них жирные, ди- и трикарбоновые, ароматические. Среди кислот преобладают щавелевая, бензойная, яблочная, лимонная, ванилиновая, линолевая и линоленовая кислоты. Ароматические кислоты представлены бензойной (88,6 мг/кг), фенилуксусной, фенолкарбоновыми – салициловой (245,1 мг/кг), ванилиновой (223,5 мг/кг), сиреневой (107,1 мг/кг) и гентиизиновой (100,7 мг/кг), гидроксикоричными – *n*-кумаровой (229,8 мг/кг) и феруловой (557,8 мкг/кг).

Впервые методом хромато-масс-спектрометрии определены компоненты эфирных масел, полученных из вегетативных и генеративных органов белокудренника черного методом микрогидродистилляции, который представлен в основном моно-, сескви- и тритерпеноидами и углеводородами; идентифицировано 48 веществ и установлено их количественное содержание. Доминирующими компонентами в эфирных маслах из листьев, стеблей, цветков белокудренника черного являются эвгенол (26,3 мг/кг), метилэвгенол (39,0 мг/кг), гермакрен D (40,2 мг/кг), кариофилленоксид (57,1 мг/кг) и его производные фарнезен (32,2 мг/кг).

В траве белокудренника черного и сборе на его основе обнаружены 19 макро- и микроэлементов; определено количественное содержание суммы фенольных соединений, гидроксикоричных кислот, флавоноидов.

Впервые методом ВЭЖХ в траве белокудренника черного выявлено 19 фенольных соединений, из которых 9 идентифицированы, это фенолкарбоновые и гидроксикоричные кислоты – розмариновая (861,00 мг/100г), эпигалловая (71,00 мг/100г), *n*-кумаровая (80,00 мг/100г), хлорогеновая (890,00 мг/100г), катехины – галлокатехин (659,00 мг/100г), эпикатехин (370,2 мг/кг), эпигаллокатехин (2929,00 мг/100г), катехингаллат (272,00 мг/100г) флавоноид – апигенин. В сырье наблюдается высокое содержание розмариновой и хлорогеновой кислот, галлокатехина и эпигаллокатехина.

Установлены морфолого-анатомические признаки вегетативных и генеративных органов белокудренника черного. Определены основные морфолого-анатомические диагностические признаки травы белокудренника черного и компонентов сбора на ее основе. Для травы белокудренника черного основными диагностическими признаками являются: листовая пластинка гипостаматическая, устьичный аппарат диацитного типа, простые одноклеточные волоски, простые волоски 2-3 клеточные с суставоподобным сочленением клеток, толстостенные с бородавчатой кутикулой; дендровидные волоски, имеющие центральный длинный большой двух-, трехклеточный волосок с лукообразной основой и бородавчатой поверхностью и пять, десять или пятнадцать одноклеточных коротких волосков, которые ответвляются от общей основы; головчатые волоски с одноклеточной ножкой и 4-х клеточной головкой, эфиромасличные железки 6-8 клеточные на стеблях, листьях, чашечках и венчиках цветков.

Разработан оптимальный состав сбора церебропротекторного действия, состоящего из травы белокудренника черного, травы яснотки белой и травы полыни австрийской в равных частях. В полученном сухом экстракте на основе сбора установлено количественное содержание гидроксикоричных кислот и флавоноидов. Проведена стандартизация сырья и сбора. Разработаны проекты МКК «Сбор церебропротекторный» и «Экстракт сбора церебропротекторного сухой».

Исследовано влияние сухого экстракта из сбора, в состав которого входят трава белокудренник черный, трава яснотки белой и трава полыни австрийской в равных количествах, на поведение животных в тесте открытого поля и антигипоксическую активность. Результаты теста открытого поля свидетельствуют о наличии выраженного седативного эффекта сухого экстракта в дозе 400 мг/кг. Эти результаты свидетельствуют о дозозависимом характере влияния исследуемого сухого экстракта на поведенческие реакции: в меньшей дозе проявляется стимуляция ориентировочно-исследовательских реакций, с увеличением дозы – седативное действие. Применение сухого экстракта в дозе 400 мг/кг увеличивает время жизни мышей по сравнению с контролем более чем в полтора раза, превосходя референт-препарат пиррацетам. Итак, сухой экстракт на основе сбора оказывает седативное и антигипоксическое действие, что свидетельствует о его церебропротекторном действии.

Ключевые слова: белокудренник чёрный, трава, листья, стебли, цветки, фармакогностическое изучение, биологически активные вещества, сбор, седативная, антигипоксическая активность.

Kolesnik Y.S. Pharmacognostic study of black horehound and the creation on its base the drugs of cerebroprotective action - The manuscript.

The thesis candidate of pharmaceutical sciences degree, specialty 15.00.02 - pharmaceutical chemistry and pharmacognosy. – National Pharmaceutical University, Health Ministry of Ukraine, Kharkiv, 2016.

In the thesis it is studied the system of black horehound study and creation on its basis the new drugs of cerebroprotective action. It is found the components and it is counted the quantity contest 18- and 3-carboned, rich, aromatic acids. It is found 19 macro and microelements in substance. It is discovered the component composition of essential oil of black horehound's vegetative and generative organs. It is identified and defined the content of 48 compounds. In substance it is defined quantitative amounts of phenolic compounds, hydroxycinnamic acids and flavonoids. It is found morphological and anatomical features of black horehound's vegetative and generative organs. It has been made the standartalisation of ta substance. It is developed the projects MQC the "Gathering of cerebroprotective" and «Extract of gathering of cerebroprotective dry». It is iscovered cerebroprotective and sedative and anti-hypoxic activity of the extract on its base. **Keywords:** black horehound, grass, leaves, stems, flowers, pharmacognostic study of biologically active substances, gethering, sedative, anti-hypoxic activity

Keywords: ballota nigra, grass, leaves, stems, flowers, pharmacognostic study of biologically active substances, collection, sedative, anti-hypoxic activity.