

АНОТАЦІЯ

Яременко М. С. Фармакогностичне вивчення кореневищ і листя лепехи звичайної та отримання субстанцій різної біологічної дії. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії 226 «Фармація» (22 – Охорона здоров'я). – Національний фармацевтичний університет, МОЗ України, Харків, 2020.

Дисертаційна робота присвячена комплексному фармакогностичному вивченню кореневищ та листя лепехи звичайної, стандартизації лікарської рослинної сировини, розробці оптимальної технології отримання лікарських рослинних препаратів з різною фармакологічною дією та їх стандартизації.

За допомогою сучасних методик ідентифікації та кількісного визначення БАР в об'єктах дослідження встановлено полісахариди, амінокислоти, леткі та фенольні сполуки, стероїди, вітаміни, макро- і мікроелементи.

Гравіметричним методом у листі та кореневищах лепехи звичайної визначено кількісний вміст полісахаридів та інших вуглеводних фракцій. Вміст водорозчинних полісахаридів був вищий у кореневищах лепехи звичайної ($3,41 \pm 0,14$ %), ніж у листі ($2,96 \pm 0,11$ %). Методом ТШХ досліджено якісний склад ВРПС листя і кореневищ лепехи, що представлений галактозою, глюкозою і фруктозою. Вміст пектинових речовин, геміцелюлози А і Б переважав у кореневищах (у 1,4, 1,5 та 1,3 рази відповідно).

У листі та кореневищах лепехи звичайної виявлено 17 амінокислот у вільному стані, а саме: аспарагінова та глютамінова кислоти, серин, пролін, цистин, гліцин, аланін, тирозин, гістидин, аргінін, треонін, валін, метіонін, ізолейцин, лейцин, фенілаланін та лізин. Сумарний вміст визначених амінокислот був вищий у листі – 10,29 %, ніж у кореневищах – 5,67 %.

Титриметричним методом визначено кількісний вміст вільних органічних кислот у перерахунку на яблучну кислоту, що у кореневищах лепехи звичайної склав $2,31 \pm 0,21$ %, а в листі – $3,17 \pm 0,18$ %. Вміст жирної олії мав незначну різницю у листі та кореневищах рослини ($1,78 \pm 0,15$ та $1,83 \pm 0,22$ % відповідно).

У листі лепехи звичайної ідентифіковано та визначено кількісний вміст 30 карбонових кислот, а у кореневищах – 29. В обох об'єктах визначено 13 жирних кислот, по 5 одно- та двоосновних карбонових кислоти. Встановлено вміст жирних кислот: левулінової – 3065,15 мкг/г у листі та 3076,07 мкг/г у кореневищах, пальмітинової – 2225,93 мкг/г у листі та 1636,06 мкг/г у кореневищах; лінолевої – 1772,63 мкг/г у листі та 2093,07 мкг/г у кореневищах. Домінували у листі: щавлева 1119,71 мкг/г, стеаринова 573,87 мкг/г та ліноленова 2760,23 мкг/г кислоти; у кореневищах: олеїнова – 474,56 мкг/г та ліноленова 920,35 мкг/г кислоти.

У листі лепехи звичайної, на відміну від кореневищ, визначено 3-гексенову, азелаїнову, гептадеканову, хенейкозанову і п-кумарову кислоти. Оригінальними для кореневищ лепехи були: міристинова, ванілінова та гексадекандикарбонова кислоти.

Загальний вміст карбонових кислот у листі лепехи звичайної складав – 15757,88 мкг/г, у кореневищах – 10501,47 мкг/г, що у 1,5 рази менше. Виявлено, що 25 сполук був однаковими для обох зразків сировини.

Методом спектрофотометрії визначено кількісний вміст суми поліфенольних сполук (у перерахунку на пірогалол) у листі – $1,24 \pm 0,01$ %, у кореневищах – $1,02 \pm 0,09$ %; суми флавоноїдів (у перерахунку на гіперозид) у листі – $0,96 \pm 0,01$ %, у кореневищах – $0,10 \pm 0,01$ %; кількісний вміст суми гідроксикоричних сполук у листі (у перерахунку на хлорогенову кислоту) – $0,82 \pm 0,01$ %.

Методом ТШХ у зразках досліджуваних об'єктів виявлено рутин, кофеїну кислоту та β -ситостерин. Методом ВЕРХ у листі ідентифіковано галову, кофеїну кислоту, апігенін, акецетин, апегінін-7-глікозид, трифолін, робінін, ізоорієнтин. Флавоноїди ізоорієнтин, робінін, трифолін, апігенін-7-глюкозид та апігенін виявлені тільки в листі лепехи, акацетин – в обох видах сировини: у листі – $69,39 \pm 2,549$ мкг/г, у кореневищах – $19,66 \pm 0,627$ мкг/г. У листі та кореневищах ідентифіковано та встановлено вміст α - і β -азаронів, на частку яких в листі припадає 56,09 %, а в кореневищах 94,48 % від усіх ідентифікованих сполук фенольної природи.

Встановлено вміст ефірної олії у кореневищах лепехи звичайної – $2,23 \pm 0,03$ % та листі – $1,93 \pm 0,12$ %. Методом газової хроматографії визначено якісний склад та кількісний вміст індивідуальних компонентів ефірної олії: у листі – 42, у кореневищах – 33; 18 з них виявилися однаковими для ефірної олії обох видів сировини. Сумарний кількісний вміст виявлених речовин у листі та кореневищах знаходився практично на одному рівні: у листі – 1730,20 мкг/г, у кореневищах – 1755,92 мкг/г.

В ефірних оліях листя та кореневищ лепехи найбільший вміст становили сесквітерпеноїди (37,8 %, 38,8 % відповідно); ароматичні речовини (25,4 % та 25,4% відповідно); монотерпеноїди (19,02 % та 20,6 % відповідно). Визначено насичені та ненасичені жирні кислоти, дитерпени, тритерпени, насичені вуглеводні.

Домінуючими компонентами в ефірній олії листя були – шиобунон 564,66 мкг/г, азарон 358,78 мкг/г, β -каріофілен, 101,24 мкг/г, аромадендрен 195,73 мкг/г; кореневищ – азарон 350,52 мкг/г, гермакєн В 168,34 мкг/г, β -каріофілен 283,90 мкг/г, ліналоол 136,76 мкг/г, δ -кадієн 136,66 мкг/г.

У листі та кореневищах лепехи звичайної ідєнтифіковано такі вітаміни: тіамін, рибофлавін, нікотинову кислоту, α -токоферол та β -каротин. Вміст вітамінів у листі в 2-3 рази вищий, ніж у кореневищах.

Дослідження антирадикальної активності у зразках сировини лепехи звичайної проводили спектрофотометричним методом в модельній системі з катіон-радикалами АБТС. У порівнянні зі стандартним зразком тролоксу (6-гідрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбонова кислота) значєння активності відносно вільних радикалів для кореневищ знаходилося у межах від 9501 до 11508 мкг/г, для листя – від 4468 до 9738,49 мкг/г сухої сировини.

Методом ВЕРХ виявлено 10 сполук фенольної природи, що виявляли антирадикальну активність, з них у листі ідєнтифіковано хлорогєнову кислоту, рутин, робінін та ізоорієнтин. Сумарне значєння становило 473,03 мкг/г для листя та 183,64 мкг/г для кореневищ. У кореневищах виявлено 5 сполук.

За результатами дослідження елементного складу сировини лепехи звичайної встановлено, що вміст важких металів не перевищував вимог ДФУ до

якості ЛРС. В усіх досліджуваних видах сировини ідентифіковано 6 макро- та 8 мікроелементів; домінуючим був калій, який становив від 49 до 72 % вмісту елементів. У мінорних кількостях знаходилися плумбум, молібден та нікель.

Визначено макро- та мікроскопічні діагностичні ознаки листя лепехи звичайної, що включені до проєкту МКЯ.

Розроблено методику ідентифікації сировини лепехи звичайної за вмістом азарону методом ТШХ, в якому як стандартний зразок використовували α -азарон. У ході дослідження підтверджено, що в усіх досліджуваних серіях вітчизняних зразків сировини міститься азарон.

Запропоновано методику кількісного визначення суми азаронів у перерахунку на α -азарон методом ВЕТШХ та розроблено методику ідентифікації сировини лепехи звичайної із визначенням граничного вмісту суми α - та β -азаронів у межах не більше 0,5 %. Новизну досліджень підтверджено патентом України на корисну модель № 133674 від 25.04.2019 р. Розроблено та валідовано методику кількісного визначення суми азаронів в перерахунку на α -азарон методом ВЕРХ. Визначено, що в обох досліджуваних об'єктах вміст суми азарону не перевищує запропоновані межі.

За результатами проведених досліджень запропоновано параметри стандартизації листя лепехи звичайної: макро- та мікроскопічні діагностичні ознаки, ідентифікація азарону, граничне визначення суми α - та β -азаронів, сторонні домішки, втрата в масі при висушуванні, вміст золи загальної, вміст золи, нерозчинної в 10% розчині кислоти хлористоводневої, кількісний вміст ефірної олії (не менше 1,0 %) та суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид (не менше 1,0 %).

Проведено визначення показників якості 7 серій кореневищ лепехи звичайної за вимогами ДФ СРСР XI видання (сторонні домішки, втрата в масі при висушуванні, зола загальна та кількісний вміст ефірної олії) та вмісту суми азаронів.

Для сировини обох видів визначено оптимальні умови екстрагування БАР та запропоновано методики отримання рідких екстрактів. Експериментально встановлено, що оптимальним екстрагентом є 70 % етанол, співвідношення

сировина : екстрагент 1 : 5, час настоювання для листя – 24 год, для кореневищ – 12 год. Новизну досліджень підтверджено патентом України на корисну модель № 138526 від 25.11.2019 р.

Стандартизацію одержаних екстрактів запропоновано проводити за такими параметрами: опис, ідентифікація азарону, сухий залишок, вміст етанолу, кількісний вміст суми α - та β -азаронів – не більше 0,5 %. Для екстракту листя лепехи звичайної додатково регламентується кількісний вміст суми флавоноїдів у перерахунку на гіперозид – не менше 0,5 %.

Уперше визначено токсичність одержаного екстракту із листя лепехи звичайної. Встановлено, що LD₅₀ понад 5000 мг/кг, тому екстракт листя лепехи звичайної належав до V класу токсичності за класифікацією Сидорова – практично нетоксичні речовини. Уперше встановлено протизапальні властивості отриманого екстракту листя на моделях карагенінового та гістамінового набряків.

У дисертаційній роботі вперше проведено комплексне фітохімічне вивчення листя та кореневищ лепехи звичайної. Проведено порівняльне дослідження основних класів БАР: полісахаридів, амінокислот, карбонових кислоти, ефірної олії, фенольних сполук, стероїдів, вітамінів, мікро- та макроелементів. Визначено антирадикальну та протизапальну активність одержаних екстрактів.

Уперше в листі ідентифіковано: кофейну та неохлорогенову кислоти, апігенін, акацетин, апігенін-7-глюкозид, трифолін, робінін, ізоорієнтин; у кореневищах – кофейну та неохлорогенову кислоти, акацетин.

Проведено дослідження з визначення оптимального терміну заготівлі листя лепехи звичайної за вмістом головних груп БАР. Визначено оптимальну фазу вегетації – масове цвітіння.

Розроблено проєкт «Лепехи кореневищ» та проєкт «Азарон» для визначення суми α - β -азаронів в лікарській сировині для внесення до ДФУ (акти впровадження за № 11/1236-5, № 11/1239-5, № 1240-5, № 11-1241-5 від 03.09.2020 р.).

Розроблено проєкти МКЯ на «Лепехи звичайної листя», «Екстракт листя лепехи звичайної» та «Екстракт кореневищ лепехи звичайної».

Результати хімічного та анатомічного дослідження упроваджено в науково-дослідну роботу споріднених закладів вищої освіти України.

Ключові слова: лепеха звичайна, листя, кореневища, фармакогностичне вивчення, біологічно активні речовини, стандартизація, екстракт, протизапальна активність.

Список публікацій здобувача

1. Гонтова Т. М., Яременко М. С. Хромато-мас-спектрометричне вивчення летких сполук кореневищ лепехи звичайної. *Збірник наук. праць співробітників НМАПО ім. П. Л. Шупика*. Київ. 2015. Вип.24, книга 5. С. 77-82 (Особистий внесок – брав участь у плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).

2. Підходи до розробки монографії «Лепехи звичайної кореневища» для включення у Державну фармакопею України / М. С. Яременко, Т. М. Гонтова, Л. М. Сіра, Е. Е. Котова, А. Г. Котов. *Управління, економіка та забезпечення якості в фармації*. 2017. № 1 (49). С. 22–26 (Особистий внесок – брав участь у плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).

3. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Сіра Л. М. До питань використання та ідентифікації неофіціальної сировини – листя *Acorus calamus* L. *Медична та клінічна хімія*. 2018. № 0 (1). С.105–110 (Особистий внесок – брав участь у плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).

4. Yaremenko M. S., Gontova T. M., Mashtaler V. V., Kotova E. E., Kotov A. G. Development of method for identification and determination of limit content of asarone in *Acorus calamus* rhizomes. *Research J. Pharm. and Tech.* 2018. Vol. 11 (6). P. 2263–2266 (Особистий внесок – брав участь у плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).

5. Yaremenko M., Gontova T., Boryak L., Mala O., Andryushayev O. Determination of optimal extraction conditions of phenolic compounds from *Acorus calamus* leaves. *EUREKA: Health Sciences*. 2020. № 3 P. 63–70 (Особистий внесок –

брав участь у плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).

6. Yaremenko M., Gontova T. The technology of production and quality assessment of the calamus liuid extract. *International independent scientific journal*. 2020. № 12. P. 47–51 (Особистий внесок – брав участь у плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень, узагальненні результатів та підготовці статті).

7. Спосіб ідентифікації кореневищ лепехи звичайної з подальшим визначенням граничного вмісту азарону : пат. 133674 України № u201805081; заявл. 05.08.2018 ; опубл. 25.04.2019, бюл. № 8 (Особистий внесок – брав участь у патентному пошуку, плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень та оформленні патенту).

8. Спосіб одержання лікувально-профілактичного засобу на основі рослинної сировини з протизапальною дією : пат. 138526 України № u201906408 ; заявл. 10.06.2019 ; опубл. 25.11.2019, бюл. №22 (Особистий внесок – брав участь у патентному пошуку, плануванні експерименту, проведенні експериментальних досліджень та оформленні патенту).

9. Яременко М. С. Изучение аминокислотного состава корневищ аира болотного / *Внедрение достижений медицинской науки в клиническую практику* : сб. материалов X науч.-практ. конф. молодых ученых и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием. Душанбе, 2015. С. 371.

10. Yaremenko M. S., Gontova T. M. Research of vitamin composition in leaves *Acorus calamus*. *Topical issues of new drugs development* : abstracts of XXIII International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student 21 April, 2016 : In 2 vol. Kharkiv : Publishing Office NUPh, 2016. Vol.1. 433 p.

11. Яременко М. С., Гонтова Т. М. Порівняльний аналіз амінокислотного складу листя та кореневищ лепехи звичайної // *Промислова фармація: Етапи становлення та майбутнє*: збірник наукових праць. Х.: Вид-во НФаУ, 2017. С. 137–140.

12. Яременко М. С., Гонтова Т. М. Контроль якості препаратів на основі лепехи звичайної. *Матеріали V науково-практичної конференції Школи молодих науковців ПАТ «Фармак»*. Київ, 2017 С. 49–51.

13. Yaremenko M. S. Research elemental composition of domestic raw *Acorus calamus* rhizomes. *Topical issues of new drugs development : Abstracts of XXIV International Scientific And Practical Conference Of Young Scientists And Student*, 20 April, 2017 : In 2 vol. Kh. : Publishing Office NUPh, 2017. Vol.1. P. 144–145.

14. Яременко М. С., Гонтовая Т. Н. Витаминный состав отечественного сырья корневищ айра обыкновенного. *Наука и медицина: современный взгляд молодежи* : сб. материалов IV междунар. науч.-практ. конф. студентов и молодых ученых Алматы, 20-21 апр. 2017 г. Алмата, 2017. С. 300-301.

15. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Котова Е. Е. Використання фармакопейних методик при вивченні флавоноїдів в сировині лепехи звичайної. *Синтез і аналіз біологічно активних речовин і лікарських субстанцій* : тези доп. Всеукр. наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 80-річчю з дня народж. д-ра. фармац. наук, проф. О.М. Гайдукевича (12-13 квіт. 2018 р.). Харків : НФаУ, 2018. С. 313–314.

16. Яременко М. С., Гонтова Т. М. Порівняльний аналіз елементного складу корневищ та листя лепехи звичайної / *Науково-технічний прогрес і оптимізація технологічних процесів створення лікарських препаратів* : матеріали VII наук.-практ. конф. з міжнар. участю, 27-28 верес. 2018 р. Тернопіль : ТДМУ, 2018. С. 57–58.

17. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Котова Е. Е. Кількісне визначення суми поліфенолів у корневищах та листі лепехи звичайної. *Теоретичні та практичні аспекти дослідження лікарських рослин* : матеріали III Міжнар. наук.–практ. internet–конф., м. Харків, 26–28 листоп. 2018 р. Харків, 2018. С. 276–277.

18. Коранг Л. А., Яременко М. С. Питання безпеки спиртового екстракту листя лепехи звичайної. *Фармакоекономіка в Україні: стан та перспективи розвитку* : матеріали X наук.-практ. конф., м. Харків, 21 трав. 2018 р. Харків : Вид-во НФаУ, 2018. С. 44.

19. Yaremenko M. S., Gontova T. M., Kotova E. E. Perspective for using *Acorus calamus* leaves in medicine. *Sciences and Pharmacy Practice 2018* : Book of abstracts 9th International Conference dedicated to the 100-th anniversary of independent Lithuania's pharmacy, Kaunas, 9 November, 2018. P. 60.

20. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Руденко В. П. Дослідження кількісного вмісту водорозчинних полісахаридів листя лепехи звичайної. *Сучасні проблеми фармакології, косметології та ароматології* : матеріали наук.-практ. конф., м. Одеса, 4 жовт. 2019 р. Одеса, 2019 р. С. 74–80.

21. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Котова Е. Е. Перспективи застосування денситометрії при визначенні кількісного вмісту азарону в кореневищах лепехи звичайної. *Сучасна фармація: історія, реалії та перспективи розвитку* : матеріали наук.-практ. конф. з міжнар. участю, присвяч. 20-й річниці заснування Дня фармац. працівника України, м. Харків, 19-20 верес. 2019 р. : у 2 т. / редкол. : А. А. Котвіцька та ін. Харків : НФаУ, 2019. Т. 1. С. 281–282.

22. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Гапоненко В. П. Дослідження кількісного вмісту полісахаридних фракцій листя лепехи звичайної. *Актуальні питання клінічної фармакології та клінічної фармації* : матеріали наук.-практ. internet-конф., м. Харків, 22-23 жовт. 2019 р. / редкол. : А. А. Котвіцька та ін. Х. : НФаУ, 2019. С. 341–347.

23. Yaremenko M. S., Gontova T. M. Quantification of asarone in *Acorus calamus* by RP-HPLC. *Science and modern pharmaceutical manufacturing* : VII Annual scientific and practical conference of Farmak's School of young scientists with international involvement, Kyiv, 21 November, 2019. *Укр. Мед. Часопис*. 2019. Т. 2, № 6 (134). P.16–17.

24. Визначення антирадикальної активності кореневищ лепехи звичайної / М. С. Яременко, Т. М. Гонтова, І. В. Безрук, В. О. Грудько. *PLANTA+*. *Досягнення та перспективи* : матеріали міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. пам'яті д. хімічних наук, проф. Ніни Павлівни Максютіної до 95-річчя від дня народження, м. Київ, 20–21 лют. 2020 р. Київ : ПАЛИВОДА, 2020. С. 144–146.

25. Перспективність розробки нових препаратів на основі листя лепехи звичайної / О. В. Андрюшаєв, О. А. Рубан, Ю. С. Маслій, М. С. Яременко. *Від*

експериментальної та клінічної патофізіології до досягнень сучасної медицини і фармації : тези доп. II наук.-практ. конф. студентів та молодих вчених з міжнар. участю, 15 травн. 2020 р. Харків : Вид-во НФаУ, 2020. С. 28–29.

26. Яременко М. С., Гонтова Т. М., Котова Е. Е. Терміни заготівлі листя лепехи звичайної (*Acorus calamus* L.) : інформ. лист № 367-2018 / Український центр наукової медичної інформації та патентоліцензійної роботи (Укрмедпатентінформ). Київ, 2018. Вип. 40. (Рішення ЕПК “Фармація” Протокол № 104 від 24.10.2018 р.).