

Міністерство охорони здоров'я України  
Національний фармацевтичний університет

Міністерство охорони здоров'я України  
Національний фармацевтичний університет

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**Москаленко Андрій Миколайович**

УДК 615.322:615.451.1:615.281:658.562

## **ДИСЕРТАЦІЯ**

**Фармакогностичне дослідження безсмертника приквіткового (*Helichrysum  
bracteatum*) та створення на його основі нових лікарських засобів**

226 – Фармація, промислова фармація

22 – Охорона здоров'я

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело

---

А. М. Москаленко

Науковий керівник Попова Наталія Вячеславівна, доктор фармацевтичних  
наук, професор

Харків – 2021

## 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 – 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.

## ANNOTATION

*Moskalenko A.M.* Pharmacognostic study of the immortelle (*Helichrysum bracteatum*) and the creation of new drugs based on it. – Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

The dissertation for the degree of Doctor of Philosophy in the specialty 226 "Pharmacy" (22 – Health Care). – National University of Pharmacy, Ministry of Health of Ukraine, Kharkiv, 2021.

The dissertation is devoted to complex pharmacognostic research immortelle's herbal drug, creation of technology production of drug based on investigated herbal drug, development of methods, parameters and criteria of standardization of herb, flowers and liquid extract of immortelle flowers. The study of antimicrobial and antifungal action as well antioxidant activity of liquid immortelle extract was also carried out.

The dissertation presents the results of our own complex pharmacognostic study of the qualitative composition and content of biologically active substances (BAS) of herb and flowers of immortelle, which were established by chemical, physicochemical and chromatographic methods of analysis: chromatography on paper, thin layer, liquid and gas. In the research the method of spectrophotometry and the method of emission absorption were also used.

For the first time, as a result of tests conducted in all studied objects, the qualitative analysis and content of BAS of different classes were studied: phenolic substances, in particular flavonoids and phenolic carboxylic acids, carbohydrates, organic and fatty acids, volatile compounds and amino acids. The mineral composition of the studied herbal drug is established.

A method of spectrophotometry for determination amount of flavonoids in herbal drug and liquid extract of immortelle flowers has been developed.

In the study of phenolic compounds using various physicochemical methods were identified in the herb and flowers of immortelle the following flavonoids: cynaroside,

luteolin, isoorientin, apigenin, kaempferol, bractein, cernuoside, aurozidine, quercetin, quercetin-3-O- $\beta$ -D-glucoside. The content of flavonoids was determined by spectrophotometric method. The amount of flavonoids was  $2.18 \pm 0.02$  % for herb,  $1.61 \pm 0.01$  % for flowers with the reference into cynaroside and dry herbal drug.

For the first time, a number of phenolic carboxylic acids were identified in herbal drug of immortelle by HPLC, in particular: gallic, hydroxyphenylacetic, caffeic, coumaric, ferulic, sinapic, cinnamic, and quinic acids. In this case, in large quantities in the flowers is quinic acid  $4981.55 \mu\text{g/g}$ , sinapic acid  $4500.11 \mu\text{g/g}$  and coumaric acid  $3092.03 \mu\text{g/g}$ , in the herb among the phenolic acids the main quinic acid is  $44257.10 \mu\text{g/g}$ . The other phenolic acids are contained in much smaller quantities.

During investigation the organic acids by HPLC, the following acids were found in the immortelle's herb and flowers: tartaric, pyruvic, isocitric, citric, succinic and malic. In large quantities, the flowers contain isocitric acid  $22979.68 \mu\text{g/g}$ , succinic acid  $7847.18 \mu\text{g/g}$  and citric acid  $2643.01 \mu\text{g/g}$ . The dominant organic acids in the herb are iso – citric acid  $67613.38 \mu\text{g/g}$ , malic acid  $24917.49 \mu\text{g/g}$  and succinic acid  $11515.72 \mu\text{g/g}$ . The rest of the organic acids are presented in much smaller quantities, their share is for the flowers –  $4284.04 \mu\text{g/g}$ , for herb –  $9295.70 \mu\text{g/g}$ .

During determination amino acids in herbal drug of immortelle by TLC, the following essential amino acids were identified: valine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, threonine, phenylalanine, among the non–essential amino acids were found: alanine, arginine, aspartic acid, histidine, glycine, glutamic acid, proline, serine, tyrosine. The content of these acids was investigated by HPLC. Among the essential amino acids in immortelle flowers, leucine  $201.9 \text{ mg/100 g}$  predominates, and among the essential amino acids in flowers, glutamic and aspartic acid  $407.2 \text{ mg/100 g}$  and  $341.2 \text{ mg/100 g}$  dominate, respectively. Among herb, leucine  $351.2 \text{ mg/100 g}$ , phenylalanine  $229.5 \text{ mg/100 g}$  and valine  $225.1 \text{ mg/100 g}$  are the most represented in herb among essential amino acids. Among the non–essential amino acids – glutamic and aspartic acid  $606.1 \text{ mg/100g}$  and  $481.8 \text{ mg/100g}$ , respectively.

As a result of identification of carbohydrate content in herbal drug of immortelle by GC / MS, it was found that immortelle flowers contain significant amounts of free sugars: sucrose 12.35 mg/g, glucose 10.43 mg/g, and bound sugars: glucose 21.97 mg/g, fucose 21.38 mg/g, arabinose 7.98 mg/g. In the immortelle herb among the identified free sugars in large quantities are sucrose 9.08 mg/g, glucose 7.37 mg/g, among bound sugars: xylose 26.84 mg/g, glucose 9.78 mg/g. Other identified sugars are found in much smaller quantities.

For the first time, as a result of gas chromatography with mass spectrometric detection (GC / MS), 26 volatile compounds were identified in immortelle herb, and 39 in flowers. As a result of determination the proportion of each of the identified substances in the total amount of volatile compounds, data were obtained that the dominant volatile compounds in the herb of immortelle are: n-hexadecanoic acid 44.48%, phytol 13.71%, 9,12-octadecanoic acid 11.21% and decamethyl tetrasiloxane 8.55%. In flowers, the main volatile compounds are: n-hexadecanoic acid 48.83%, 9,12-octadecanoic acid 19.52%, methyl ester of 7,10,13-hexadecatrienoic acid 8.85% and tetradecanoic acid 6.10%. The remaining identified compounds are contained in much smaller quantities.

As a result of the study of fatty acids of herbal drug of immortelle by GC / MS were at first identified in the herb: lauric acid, laurooleic acid, palmitic acid, caproic acid, linoleic acid,  $\alpha$ -linolenic acid, stearic acid, arachic acid, behenic acid, lignoceric acid, cerotic acid. In the flowers were at first identified: lauric acid, palmitic acid, linoleic acid,  $\alpha$ -linolenic acid, stearic acid, arachic acid, behenic acid, lignoceric acid.

Among the identified fatty acids in immortelle flowers are significant amounts of fatty acids: from unsaturated fatty acids: linoleic 4.10 mg/g and  $\alpha$ -linolenic acid 2.07 mg/g. Of the saturated fatty acid: palmitic acid 3.32 mg/g. In immortelle herb among the identified fatty acids in large quantities are also present these acids, but in other quantities: palmitic acid 3.61 mg/g, of the unsaturated: linoleic 2.85 mg/g and  $\alpha$ -linolenic acid 2.23 mg/g, other identified fatty acids are found in much smaller quantities.

During studying the mineral composition of immortelle's herbal drug for the at first it was found that the plant has a very high content of important minerals (mg / 100g):

potassium: herb – 2670, flowers – 1660, roots – 3880; calcium: herb – 960, flowers – 310, roots – 1350; magnesium: herb – 270, flowers – 155, roots – 375; iron: herb – 23.5, flowers – 7.8, roots – 32.80; sodium: herb – 375, flowers – 310, roots – 450; copper: herb – 6.4, flowers – 3.6, roots – 6.7.

To determine the amount of extractable matters when using different solvents, a study was conducted and determined that the most optimal solvent is 70% ethanol. The content of extractable matters for herb is  $26.77 \pm 0.21\%$ , for flowers –  $25.00 \pm 0.24\%$ . When studying the dynamics of extraction of extractable matters by successive overflows, it was concluded that up to 5 overflows remove most of the extractable matters and flavonoids. Thus, to obtain a drug, the optimal ratio of herbal drug – finished extract is a ratio of 1:5.

Technological parameters were determined for immortelle's herbal drug: weight loss during drying; average particle size; specific mass of herbal drug; bulk mass of herbal drug before and after shrinkage; bulk density of herbal drug; water absorption coefficient; absorption coefficient of ethanol (70% v/v); porosity of herbal drug; the cut of the layer; free volume of the layer; total ash. These parameters are necessary for the creation of a rational technological industrial process for the production of liquid extract of immortelle flowers and the development of draw of quality control methods (QCM) for herb, flowers and immortelle flowers liquid extract.

As a method of obtaining the extract a modern innovative method of vacuum filtration extraction was used. This method allows you to get extractable matters that determine the pharmacological activity of the extract; in addition, this method is quite commercially attractive: low cost, time-consuming, does not require high – cost equipment. It should also be noted that this method is more attractive in terms of HACCP certification, because there is a minimal risk of critical control points in the manufacture of products. All this gives confidence in the commercial future success of the drug «Immortelle flowers liquid extract».

When studying the antibacterial properties of immortelle of extracts compared extracts of herb and flowers, which were prepared in the ratio: herbal drug – finished

extract 1:5, while the extractable used ethanol of different concentrations and water. This was done to compare the antimicrobial activity, which depends on many factors, including the type of herbal drug, solvent and production technology. For the first time, the sensitivity of microorganism strains to the studied samples of immortelle extracts was determined. It was found that all studied samples of extracts of herb and flowers of immortelle have antibacterial activity against reference test cultures of microorganisms (diameter of the growth retardation zone - from 15.2 to 25.4 mm) and antifungal action against the reference strain *Candida albicans*, (diameter of the growth retardation zone - from 17.2 to 19.3 mm). But in relation to clinical strains, antibacterial activity is more pronounced in alcoholic extracts of herb and flowers against *Staphylococcus aureus*, (diameter of the growth retardation zone 20.7 mm for 70% alcohol extract of flowers), *Escherichia coli*, (diameter of the growth retardation zone 18.3 mm for alcohol 70% extract of flowers), *Klebsiella pneumoniae*, (diameter of the growth retardation zone 17.3 mm for alcohol 70% extract of flowers), *Candida albicans*, (diameter of the growth retardation zone 16.7 mm for alcohol 70% extract of herb), *Aspergillus niger*, (diameter of the growth retardation zone 15.7 mm for alcohol 70% extract of flowers). Regarding clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa* antimicrobial activity have only alcohol 70% extracts of flowers and herb (diameter of the growth retardation zone 16.2 mm for extract of herb and 15.7 mm for extract flowers). In general, the antimicrobial effect of 70% alcohol extract flowers more expressed.

The novelty of these studies is confirmed by the patent of Ukraine for the utility model "Drug with antimicrobial and antifungal action on a plant basis."

To study the antioxidant activity of extract of immortelle herb was used chemiluminescent method (CM), using as an activator luminol. This method allowed to determine the total number of free radicals that bind the extract of immortelle herb in the test sample and to analyze the total antioxidant capacity. It was experimentally established that the extract of immortelle herb in the system:  $H_2L_2 - H_2O_2 - Hb$ , leads to a decrease in the maximum intensity of the glow. It was found that the dilution value was chosen according to the characteristics of antioxidant properties, at which the reduction of CL by

50% is achieved. It has been experimentally established that  $I / I_0$  is achieved by 50% when the extract is in the ratio 7.5: 1000, which indicates the high antioxidant properties of immortelle herb of the extract.

At the first time, a thorough analysis of the morphological and anatomical features of the immortelle was performed. Diagnostic anatomical features of the structure of different parts of herbal drug were established.

Pharmacognostic research and determination of technological parameters of herbal drug and liquid extract of flowers, which became the basis for the developed draft of QCM: "Immortelle herb", "Immortelle flowers" and "Immortals flowers liquid extract".

The results of the study of the anatomical structure of herb, flowers and roots of immortelle were adopted into the research work of the Department of Pharmacognosy and Department Botany of the National University of Pharmacy, Department of Pharmacognosy with Medical Botany of I. Horbachevsky Ternopil National Medical University of Ukraine, Department of Chemistry and Pharmacy of Nizhyn Gogol State University.

*Key words:* immortelle, flowers, herb, pharmacognostic study, liquid extract, antimicrobial and antifungal action, antioxidant action, biologically active substances, quality control methods.



## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ	20
ВСТУП	21
РОЗДІЛ 1 БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА ВИКОРИСТАННЯ РОСЛИН РОДУ ЦМИН (Огляд літератури)	27
1.1 Ботанічна характеристика та хімічний склад рослин роду Цмин	27
1.2 Ботанічна характеристика безсмертника приквіткового	34
1.3 Хімічний склад безсмертника приквіткового	40
1.4 Дослідження біологічної активності та застосування безсмертника приквіткового	40
Висновки до розділу 1	41
РОЗДІЛ 2 ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕНЬ	43
2.1 Відомості про об'єкти дослідження, прилади, методики та реактиви	43
2.2 Ідентифікація та визначення вмісту біологічно активних речовин у сировині безсмертника приквіткового	45
2.2.1 Дослідження фенольних сполук	45
2.2.2 Дослідження флавоноїдів	45
2.2.3 Визначення вмісту суми флавоноїдів	46
2.2.4 Дослідження фенолкарбонових кислот	48
2.2.5 Дослідження органічних кислот	49
2.2.6 Аналіз вуглеводів	50
2.2.7 Дослідження летких сполук	51
2.2.8 Дослідження амінокислот	52
2.2.9 Дослідження жирних кислот	53
2.2.10 Дослідження мінеральних речовин	55
2.3 Дослідження антиоксидантних властивостей екстракту трави безсмертника приквіткового	56
2.4 Дослідження антимікробної та протигрибкової дії екстрактів трави	56

та квіток безсмертника приквіткового	57
2.5 Дослідження морфолого-анатомічної будови сировини безсмертника приквіткового	62
2.6 Дослідження технологічних параметрів сировини безсмертника приквіткового	62
<b>РОЗДІЛ 3 ДОСЛІДЖЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ І ВМІСТУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН СИРОВИНИ БЕЗСМЕРТНИКА ПРИКВІТКОВОГО</b>	<b>69</b>
3.1 Вивчення складу фенольних сполук	69
3.2 Визначення складу та вмісту флавоноїдів	72
3.3 Дослідження вмісту суми флавоноїдів	74
3.4 Встановлення складу та вмісту фенолкарбонічних кислот	76
3.5 Дослідження складу та вмісту органічних кислот	80
3.6 Дослідження вуглеводів	83
3.7 Встановлення складу летких сполук	91
3.8 Дослідження амінокислот	97
3.9 Дослідження складу та вмісту жирних кислот	103
3.10 Вивчення мінеральних речовин	106
Висновки до розділу 3	108
<b>РОЗДІЛ 4 МОРФОЛОГО-АНАТОМІЧНИЙ АНАЛІЗ СИРОВИНИ БЕЗСМЕРТНИКА ПРИКВІТКОВОГО</b>	<b>115</b>
4.1 Морфологічний аналіз сировини безсмертника приквіткового	115
4.1.1 Морфологічний аналіз неподрібненої сировини безсмертника приквіткового	115
4.1.2 Морфологічний аналіз подрібненої сировини безсмертника приквіткового	116
4.2 Анатомічний аналіз сировини безсмертника приквіткового	117
Висновки до розділу 4	128
<b>РОЗДІЛ 5 ОДЕРЖАННЯ СУБСТАНЦІЇ З СИРОВИНИ БЕЗСМЕРТНИКА ПРИКВІТКОВОГО І ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ</b>	<b>130</b>

5.1 Дослідження технологічних параметрів сировини безсмертника приквіткового	130
5.2 Одержання екстракту з сировини безсмертника приквіткового	158
5.3 Стандартизація сировини та екстракту безсмертника приквіткового	162
5.3.1 Визначення показників якості безсмертника приквіткового трави	162
5.3.2 Визначення показників якості безсмертника приквіткового квіток	166
5.3.3 Визначення показників якості безсмертника приквіткового квіток рідкого екстракту	169
5.4 Вивчення антимікробної та протигрибкової дії безсмертника приквіткового трави та квіток рідких екстрактів	172
5.5 Антиоксидантні властивості екстракту безсмертника приквіткового трави	177
Висновки до розділу 5	178
ВИСНОВКИ	180
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	185
ДОДАТКИ	196

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

АЕС – атомно-емісійна спектрофотометрія;

БАР – біологічно активні речовини;

ВАК – вільні амінокислоти;

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія;

ГХ/МС – газова хроматографія з мас-спектрометрією;

ДСЗ – Державний стандартний зразок;

ДЕЦ МОЗ України – Державний експертний центр Міністерства охорони здоров'я України;

ДФУ – Державна фармакопея України;

ЗАЄ – загальна антиоксидантна ємність;

ЗАК – загальний вміст амінокислот;

ЛЗ – лікарський засіб;

ЛР – лікарські рослини;

ЛРС – лікарська рослинна сировина;

МКЯ – методи контролю якості;

РП – розчин порівняння;

ПХ – хроматографія на папері;

РЕ – рідкий екстракт;

ТШХ – тонкошарова хроматографія;

ХМ – метод хемілюмінесценції;

УФ спектроскопія – ультрафіолетова спектроскопія;

ФСЗ – фармакопейний стандартний зразок.

## ВСТУП

### Обґрунтування вибору теми дослідження

Лікарські рослини (ЛР) є унікальним джерелом різноманітних сполук – біологічно активних речовин (БАР), які застосовуються як для профілактики, так і для лікування різних захворювань людини. Останнім часом спостерігається стійка тенденція до підвищення інтересу до лікарських препаратів на основі рослин. Це продиктовано рядом причин, але перш за все це пов'язано з особливостями цих лікарських препаратів: унікальному поєднанні високої ефективності і безпеки при використанні; комплексній дії, коли мова йде не про одну фармакологічну дію, а про багатофакторний терапевтичний вплив на організм. При цьому ряд речовин забезпечують основну фармакологічну дію, а інші підсилюють цю дію. У сучасних умовах розвитку медицини лікар і пацієнт, обговорюючи найбільш ефективну і безпечну схему терапії захворювання, все частіше роблять вибір на користь використання препаратів на основі ЛР.

ЛР важливим об'єктом вивчення з метою пошуку нових лікарських засобів. Варто відзначити, що розробка близько половини рецептурних лікарських препаратів здійснилася завдяки вивченню рослин. Фармацевтична промисловість виробляє синтетичні аналоги природних БАР, які раніше були виділені з рослин. Окремою проблемою є катастрофічне винищення ЛР. Цьому сприяє хижацька заготівля, при якій порушуються правила заготівлі, та екологічні фактори, що пов'язані з урбанізацією, винищенням лісів, розширенням сільськогосподарських земель. Лікарські засоби на основі рослин використовуються практично в усіх сферах медицини. Незважаючи на досягнення в створенні синтетичних лікарських засобів, експерти ВООЗ вважають, що розвиток виробництва фітопрепаратів є пріоритетним та майбутнє медицини за засобами природного походження. Наприклад, у Індії в 2014 році було створено окреме міністерство традиційної медицини, яке займається регулюванням і популяризацією альтернативної медицини, в тому числі методів застосування засобів, виготовлених із сировини аюрведичних ЛР для профілактики та

лікування різних захворювань. В Індії на ряду з дією офіційної Державної фармакопеї діє окрема аюрведична фармакопея з ЛР.

Тому, зростання інтересу до ЛР пов'язано, з одного боку, з унікальністю дії фітопрепаратів, з іншого боку, це відносна дешевизна фітопрепаратів у порівнянні з синтетичними. Доступність, дешевизна вирощування та простий процес заготівлі, підготовки до транспортування є дуже важливими факторами з точки зору комерційної привабливості створення лікарських засобів на основі рослинної сировини. Наукові дослідження проводяться за двома напрямками: це пошук нових терапевтичних ефектів рослин, які вже використовуються в офіційній медицині з метою розширення сфери використання, та всебічне дослідження рослин, які не є офіційними, але є таксономічно є близькими, родинними рослинами до них. Однією з таких рослин є безсмертник приквітковий (*Helichrysum bracteatum*). Ця рослина відноситься до роду Цмин та є близькою до безсмертника піщаного, який широко використовується в медицині при захворюваннях гепатобіліарної системи. Фармакологічні властивості безсмертника піщаного обумовлені наявністю цінних БАР, які були ретельно досліджені. Тому перспективним є всебічне вивчення інших представників цього роду.

### **Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами, грантами**

Дисертаційна робота виконана у відповідності з планом проблемної комісії «Фармація» МОЗ та НАМН України і є фрагментом комплексної науково – дослідної роботи Національного фармацевтичного університету «Фармакогностичне дослідження лікарської рослинної сировини та розробка фітотерапевтичних засобів на її основі» (номер державної реєстрації 0114U000946).

### **Мета та завдання дослідження**

Метою дисертаційної роботи було проведення комплексного фармакогностичного дослідження безсмертника приквіткового трави та квіток (*Helichrysum bracteatum*), одержання субстанцій на їх основі та вивчення фармакологічної активності одержаних субстанцій.

Для досягнення поставленої мети необхідно було вирішити такі завдання:

- систематизувати вітчизняні та закордонні джерела літератури щодо ботанічних ознак, розповсюдження, хімічного складу, біологічних особливостей та фармакологічної дії рослин роду Цмин;
- проаналізувати існуючі дані про об'єкт дослідження;
- провести фітохімічний аналіз безсмертника приквіткового трави та квіток, дослідити якісний склад і визначити вміст основних БАР;
- провести морфолого-анатомічний аналіз стебла, квіток, листя і підземних органів безсмертника приквіткового;
- одержати фармакологічно активні субстанції з трави і квіток безсмертника приквіткового та дослідити антиоксидантну і антимікробну дію;
- розробити проекти методів контролю якості МКЯ на рослину сировину безсмертника приквіткового та безсмертника приквіткового рідкий екстракт;

*Об'єкт дослідження* – комплексне фармакогностичне дослідження безсмертника приквіткового трави та квіток, вивчення лікарського рослинного засобу на основі сировини безсмертника приквіткового

*Предмет дослідження* – якісний аналіз БАР трави і квіток та визначення їх вмісту; макро - та мікроскопічне вивчення досліджуваної сировини; технологічні аспекти розробки субстанцій з трави і квіток безсмертника приквіткового та вивчення їх антимікробної і протигрибкової дії та антиоксидантних властивостей; розробка проектів МКЯ; визначення технологічних параметрів сировини.

### **Методи дослідження**

При виконанні дисертаційної роботи якісний склад сировини вивчали із застосуванням хімічних реакцій, хроматографічних методів (паперової (ПХ), тонкошарової (ТШХ), газової з мас-спектрометричним детектором (ГХ/МС), високоефективної рідинної (ВЕРХ), вміст БАР досліджували гравіметричним, титриметричним, спектрофотометричним, хроматографічним (ГХ та ВЕРХ) методами. Для визначення мінерального складу сировини застосовували атомно-емісійний спектрографічний метод (АЕС).

Для проведення мікроаналізу сировини використовували мікроскоп МС 10 та фотокамеру Sony DSC-W80. Статистичну обробку результатів експериментальних досліджень проводили згідно з вимогами ДФУ.

### **Наукова новизна отриманих результатів**

Вперше проведено комплексне фармакогностичне дослідження безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*) трави та квіток. Здійснено вивчення якісного складу і визначення вмісту основних груп БАР сировини досліджуваного об'єкту.

Вперше встановлено наявність флавоноїдів, гідроксикоричних, фенолкарбонових та органічних кислот, вуглеводів, амінокислот, летких сполук, жирних кислот та мінеральних речовин у безсмертника приквіткового трави та квітках.

Вперше ідентифіковано та визначено вміст у безсмертника приквіткового трави та квітках 3 флавоноїдів, 8 фенолкарбонових та 6 органічних кислот, 16 амінокислот, 11 жирних кислот, 12 вуглеводів, 5 макро та 10 мікроелементів. У траві безсмертника приквіткового було ідентифіковано 26, а в квітках –39 летких сполук.

Вперше було детально досліджено морфолого-анатомічну будову стебла, квітки, листка, кореня безсмертника приквіткового та встановлено їх основні макро-і мікродіагностичні ознаки, які включено до проєкту МКЯ на сировину безсмертника приквіткового. Розроблено технологію отримання та методи стандартизації екстракту квіток безсмертника приквіткового.

Вперше досліджено антимікробну та протигрибкову дію безсмертника приквіткового екстрактів квіток та трави, при цьому проведено порівняльний аналіз антимікробних властивостей екстрактів трави і квіток одержаних зі застосуванням різних екстрагентів.

Вивчено антиоксидантні властивості безсмертника приквіткового трави екстракту.

Новизна досліджень підтверджена патентом України на корисну модель за № 145563 від 28.12.2020 «Лікарський засіб антимікробної та протигрибкової дії на рослинній основі».



## **Практичне значення отриманих результатів**

Результати досліджень дисертаційної роботи впроваджено в науково-дослідну роботу та навчальний процес 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.

Розроблено технологію одержання методом вакуумно-фільтраційної екстракції рідкого екстракту з квіток безсмертника приквіткового. Розроблено проекти МКЯ на нову лікарську рослинну сировину «Безсмертника приквіткового трава», «Безсмертника приквіткового квітки», та екстракт «Безсмертника приквіткового квіток екстракт рідкий».

## **Особистий внесок здобувача**

Безпосередньо автором здійснено:

- аналіз літератури за темою дисертації;
- дослідження БАР: фенольні сполуки, флавоноїди, фенолкарбонів, органічні та жирні кислоти, вуглеводи, леткі сполуки, амінокислоти та мінеральні елементи;
- вивчення технологічних параметрів трави та квіток безсмертника приквіткового;
- визначено критерії стандартизації та розроблено проекти МКЯ трави і квіток безсмертника приквіткового;
- одержання рідких екстрактів на основі трави і квіток безсмертника приквіткового.
- визначено критерії стандартизації та розроблено проект МКЯ безсмертника приквіткового квіток рідкого екстракту.

Наукові роботи опубліковані у співавторстві з Поповою Н. В., Литвиненко В. І., Бобрицькою Л. О., Гладухом Є. В., Бондаренко Н. Ю., Блажеєвським М. Є. де дисертанту належить фактичний матеріал і основний творчий доробок.

## **Апробація результатів дисертації**

Основні положення дисертаційної роботи було представлено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня: XXV Міжнародній науково-

практичній конференції молодих вчених та студентів «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (Харків, 18-10 квітня 2018р.); 9th International Pharmaceutical Conference «Scientific and Practical 2018» (Kaunas, 9 November 2018); XXVI Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (Харків, 10-12 квітня 2019 р.); XXVII Міжнародній науково-практичній конференції молодих вчених та студентів «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (Харків, 08-10 квітня 2020 р.).

### **Обсяг і структура дисертації**

Дисертаційна робота складається з анотації, вступу і п'яти розділів, також робота містить загальні висновки, використані джерела літератури та додатки. Загальний обсяг дисертації складає 211 сторінок друкованого тексту, обсяг основного тексту – 144 сторінки. Робота ілюстрована 64 таблицями і 38 рисунками. Перелік використаних літературних джерел містить 109 найменувань, з яких кирилицею – 79, латиницею – 30.

# РОЗДІЛ 1

## БОТАНІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА, ХІМІЧНИЙ СКЛАД ТА ВИКОРИСТАННЯ РОСЛИН РОДУ ЦМИН (Огляд літератури)

### 1.1 Ботанічна характеристика та хімічний склад рослин роду Цмин

Цмин (*Helichrysum*), або безсмертник, або сухоцвіт, це рід рослин, які відносяться до родини айстрові (*Asteraceae*) та містить близько 500 видів. Родина айстрові є більш розвинутим таксоном класу дводольних та має велике значення для виробництва лікарських засобів і проведення фармакогностичних досліджень. Рослини родини айстрові поширені на більшій частині землі практично в усіх кліматичних умовах.

Назва роду *Helichrysum* походить від грецьких слів «*helios*» - сонце і «*chrysos*» - золото і відображає характерну зовнішність суцвіть цього роду рослин. Це багаторічні трав'янисті рослини або напівчагарники, як правило, завдяки густому опушенню мають сиве забарвлення [2]. Рід поширений в Австралії, Африці, (244 види в Південній Африці), на Мадагаскарі та Євразії [27]. Рід *Helichrysum* дуже поліморфний, його таксономія заснована на недостатньо виражених і мінливих ознаках, які залежать від умов зростання: особливості ґрунту, інсоляції, кількості опадів та віку рослини [77].

На території країн СНД найбільшим центром видової різноманітності роду є Кавказ та Середня Азія. Найбільші площі ареалів на території Кавказу мають види: цмин хвилястий (*H. undulatum*), цмин складчастий (*H. plicatum*), цмин дуже запашний (*H. graveolens*), цмин вірменський (*H. Armenium*) [51].

В Україні росте 5 видів роду Цмин, найпоширенішим з них є цмин пісковий (безсмертник піщаний) (*Helichrysum arenarium*), а цмин італійський (*Helichrysum italicum*) культивується [14].

Цмин пісковий (*Helichrysum arenarium*) багаторічна трав'яниста рослина (15-30 см заввишки) з прямостоячими або висхідними стеблами, вкритими біло-повстяним опушенням. Прикореневі листки сидячі, цілісні, довгасто-зворотньоаяцеподібні, стеблові листки чергові, ланцетні. Квітки солом'яно-жовті, жовтогарячі, іноді бувають цеглясті, дрібні, зібрані в кулясті кошики (до 10 мм у діаметрі), які утворюють на верхівках стебел густі щиткоподібні суцвіття. Обгортки кошиків черепичасті, листки їх твердуватоплівчасті, солом'яно-жовтого або жовтогарячого кольору. Крайові квітки в кошиках маточкові, трубчасті, ниткоподібні, численні, однорядні. Серединні квітки двостатеві, трубчасті, з п'яти-зубчастим відгином. Тичинок п'ять із зрослими пиляками, маточка одна, з одним стовпчиком, нижньою зав'яззю і дволопатевою приймочкою. Плід сім'янка (до 1,5 мм завдовжки) з чубком з одного ряду білих ламких волосків [57].

Безсмертник добре росте на різних ґрунтах, рослина світлолюбна, досить посухостійка. Цвіте з липня по вересень та розповсюджена майже по всій Україні. Але з урахуванням того, що об'єми заготівлі цмину піскового значно скорочуються у зв'язку зі зменшенням площ дикорослого цмину, можливості заготівлі сировини не покривають потреб фармацевтичної промисловості.

У Криму (радгосп «Райдуга» Сімферопольського району) вдало культивується, як ефіроолійна рослина, цмин італійський (врожайність сухих суцвіть досягає 2-3 т/га), батьківщиною якого є середземноморське узбережжя Європи та Північної Африки [54]. Також рослина культивується на ділянках Дослідної станції лікарських рослин інституту агроєкології та природокористування Національної академії аграрних наук України в м. Лубни Полтавської області.

Основними областями промислових заготівель дикорослого безсмертника піскового є Волинська, Житомирська, Харківська, Запорізька, Дніпропетровська, Полтавська, Київська, Чернігівська, Рівненська, Черкаська та Херсонська області. Врожайність вологих суцвіть дикорослого безсмертника піщаного складає 0,1 т/га, при культивуванні врожайність сухих суцвіть – 0,8 – 1,4 т/га. Культивування є більш вигідним у порівнянні зі збором дикорослої сировини [11, 16, 76, 77].

Цмин пісковий є найбільш вивченим представником роду Цмин, на основі сировини виготовляється ряд лікарських препаратів.

*Безсмертник італійський (Helichrysum italicum)* – півчагарник висотою 50-60 см, діаметром 40-50 см. Стебло сильно ребристе, прямостояче. Листя дрібне (завдовжки 2-5 см, завширшки 1-2 см), сидяче, вузько-лінійне, з сильно заломленими краями, опушене. Листя спочатку сизе, потім - майже біле. Суцвіття головчате, щільне, зібране в щиток на верхівці пагонів. Кошики великі, діаметром 4-5 см, у фазі бутонізації - кулясті. На одній рослині розвивається 300-770 суцвіть. Квітки трубчасті, жовті, складаються з п'яти пелюсток, п'яти тичинок і однієї маточки. На квітколожі по спіралі розташовані 13-19 квіток-кошиків, щільно прилеглих один до одного. Крайові квітки жіночі, інші двостатеві, оточені обгорткою, що складається з 25 шкірястих листочків, які розташовані як черепиця. При дозріванні сім'янок листки обгортки залишаються зімкненими. За формою вони різні: внутрішні – вузькоколіїні, лопатоподібні (довжина перевищує ширину в три-чотири рази), середні - довгасті (довше в 1,5-2 рази за зовнішні). Функцію чашолисток виконує добре розвинена обгортка, віночок симетричний, п'ятичленний. Плід - сім'янка округлої форми, без ребер, дрібна (1-2 мм). Рослина поширена в Італії, на узбережжі Франції та Іспанії, на островах Корсика, Ельба і Кіпр. Культивується в Україні.

Згідно з даними літератури, в результаті досліджень рослин роду Цмин було встановлено досить різноманітний склад хімічних сполук, серед яких, важливими є фенольні сполуки. Було виявлено близько 50 сполук фенольної природи, які накопичуються в наземній частині рослини і, перш за все, у квітках. В основному, це глікозиди та аглікони флавоноїдів, кумарини, похідні гідроксикоричних кислот.

За кількістю ідентифікованих флавоноїдних глікозидів найбільший вміст мають цмин багатолістий, цмин складчастий та цмин дуже запашний (22-27 сполук), а також цмин пісковий – 24 сполуки [16, 63, 66].

#### *Флавоноїди*

Для вивчених рослин роду Цмин характерні О-глікозиди. Основні флавоноїди наведено у порівняльній таблиці 1.1 [28].

Таблиця 1.1

## Якісний склад флавоноїдів рослин роду Цмин

Вид цмину Група БАР, Речовина		Ц. піщаний	Ц. араксинський	Ц. вірменський	Ц. дуже запашний	Ц. самаркандський	Ц. Паласа	Ц. складчастий	Ц. багатолістий	Ц. хвилястий	Ц. італійський
Флаволи	Апігенін	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	Лютеолін	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
флавоноли	Кемпферол	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	Кверцетин	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
флаваноли	Астрагалін	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	Нарінгенін	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
	геліхризин А	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
	геліхризин В	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	геліхризин	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
халкони	Ізогеліхризин	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Вміст суми флавоноїдів у квітках, %		6,5	4,5	4,0	7,0	10,2	6,7	4,0	7,0	4,5	10,3

Практично в усіх вивчених рослинах роду Цмин присутні флаволи лютеолін і апігенін та флавоноли кемферол і кверцетин.

Вміст суми флавоноїдів у сировині цмину піщаного складає 3,5–7 %, у цмину самаркандського - 6,58–15,3 %. При цьому вміст флавоноїдів визначається в

перерахунку на ізогеліхризин, вміст якого у сировині цмину піскового і цмину самаркандського відповідно складає 1,31–1,5 % і 3,7–4 % [6, 14]. Для визначення суми флавоноїдів у суцвіттях цмину піскового застосовували метод диференціальної спектрофотометрії в перерахунку на рутин, з'ясовано що вміст флавоноїдів складає 2,68–6,88 % [61]. Літературні джерела надають дані про флавоноїдний склад ряду рослин роду Цмин Південної Африки та Середземномор'я, зокрема цмин блискучий (*Helichrysum aureonitens*) містить 3,5,7-тригідроксифлавоон або галангін, а з цмину запашного (*Helichrysum odoratissimum*) були виділені такі сполуки, як 3,5-дигідрокси-6,7,8-триметоксифлавоон, або геліхризетин та 3-0-метилкверцетин [104, 106]. Надземна частина цмину італійського, крім флавоноїдів зазначених у таблиці, містить також глікозиди: 3-глікозид кемпферолу, 5-глікозид нарінгеніну та 4,2,4',6'-тетрагідроксихалкон-2-глюкозид, геліхризид та 7-галактозид 5,6,7,8,3',4'-гексагідроксифлавоону [23, 30, 88]. При визначенні суми фенольних сполук методом спектрофотометрії в спиртовому екстракті цмину італійського, в перерахунку на хлорогеновою кислоту та кверцетин, були отримані наступні результати 27,9–29,0 % та 13,6–14,3 % відповідно [56].

#### *Гідроксикоричні кислоти*

Згідно літератури у рослинах роду Цмин присутні *p*-кумарова, кофейна та ферулова кислоти, та інші фенолкарбонові кислоти [25]. Були виявлені монокофеїлхінні кислоти: неохлорогенова, (3-0-кофеїлхінна кислота), кріптохлорогенова, (4-0-кофеїлхінна кислота), хлорогенова, (5-0-кофеїлхінна кислота). Дикокофеїлхінні кислоти представлені 1,3-дикофеїлхінною, 1,4-дикофеїлхінною, 1,5-дикофеїлхінною, 3,5-дикофеїлхінною та 4,5-дикофеїлхінною [29, 74].

Для цмину італійського клас фенольних сполук є найбільш дослідженим. При аналізі водного екстракту цмину італійського було встановлено, що 10–20 % від загальної кількості фенольних сполук є флавоноїди, а відповідно 80–90 % гідроксикоричні кислоти.

Загальна сума хлорогенової кислоти складає 69,04 % серед монокофеїлхінічних кислот, серед дикофеїлхінічних кислот 53,86 % приходить на 1,5-дикофеїлхінічну кислоту [73].

#### *Кумарини*

Більш досконало кумаринові сполуки вивчені у цмину піскового та цмину самаркандського. Ці рослини містять 6-метокси-7-гідроксикумарин (скополетин), який складає основну частину, а також 7-гідроксикумарин (умбеліферон) і 6,7-дигідроксикумарин (ескулетин). За допомогою методів ПХ та ТШХ було встановлено у цмину італійського наявність скополетину та кумарину, аналіз проводили в порівнянні зі стандартними зразками [5, 30].

#### *Похідні фталевої кислоти*

У цмину піскового, цмину багатолістого та цмину складчастого було ідентифіковано 5-метокси-7-гідроксифталід. Суцвіття цмину піскового та цмину італійського містять 5,7-дигідроксифталід і 5,7-диметоксифталід [109].

#### *Полісахариди*

Цмин пісковий містить гомоґалактуронову і пектову кислоти, які утворюють полісахаридний комплекс. Після гідролізу цього комплексу виявляють такі сполуки: галактуронова кислота (88 %), галактоза (3,25 %), глюкоза (2,1 %), арабіноза (2,3 %), ксилоза (2,1 %), рамноза (0,8 %) [79].

У результаті досліджень полісахаридного комплексу цмину італійського, вихід якого складає 7 %, було виявлено, після гідролізу, такі сполуки: рамнозу, арабінозу, галактозу, глюкозу та глюкуронову кислоту [10].

#### *Біологічно активні речовини різних класів*

Цмин пісковий містить дитерпенові спирти, стерини, жирні кислоти, інозит, а також глюкуронід  $\beta$ -сітостерин та циклітол, L-інозид [85]. Водний екстракт цмину італійського містить амінокислоти: лізин, серин, аланін, пролін, метіонін; карбонові кислоти: яблучну, бурштинову, винну. У наземній частині цмину італійського було визначено вміст вільних карбонових кислот (3,23 %) та загальну суму вільних та зв'язаних кислот (4,09 %) [56]. При аналізі суцвіть цмину хвилястого було



ідентифіковано: вітамін К, терпеноїд геліотрин, дубильні речовини, аскорбінову кислоту [98]. Деякі рослини роду Цмин містять поліізопрен – каучук [24].

У суцвіттях цмину італійського та цмину хвилястого ідентифіковані флороглюциноли: італіпірон, плікатіпірон, геліпірон [40]. Також цмин італійський у своєму складі містить тритерпени:  $\alpha$ -амірин, уваол, урсулову кислоту та її лактон; стерол,  $\beta$ -сітостерол [26]. Як правило рослини роду Цмин мають у своєму складі незначну кількість ефірної олії. Найбільш вивчений цмин пісковий містить 0,04 % ефірної олії, цмин італійський – 1,25–1.36 %, основними компонентами якої є  $\alpha$ -пінен,  $\beta$ -пінен, камфен, цитронелол і нерол [62, 72]. Також рослини роду Цмин мають у своєму складі солі, що утворені різними мінеральними елементами [58].

Офіційною рослиною роду Цмин (*Helichrysum*) є *Helichrysum arenarium* – цмин пісковий, квітки якого включені до Фармакопеї СРСР XI видання [18] та ДФУ, а також до Фармакопей Польщі та Німеччини [89, 103].

Вивчення фармакологічних властивостей екстрактів квіток цмину піскового свідчить про їх антиспастичну дію на гладку мускулатуру кишечника, жовчного міхура та кровоносних судин [38].

Препарати цмину виявляють жовчогінну і гіпотензивну дію. Слід зауважити, що найбільшу ефективність мають спиртовий екстракт та настояка цмину, настої і відвари чинять значно меншу активність. Це пов'язано з тим, що флавонові сполуки слаботорозчинні у воді і пероральне вживання їх не забезпечує достатнього всмоктування діючих речовин. Рослина містить значну кількість гіркот, які активізують виділення шлункового соку. Крім того, виявлено слабку протизапальну та протигістамінну дію цмину. Було встановлено, що настій та відвар його квіток активізують секрецію жовчі, шлункового і панкреатичного соку [59]. Препарати цмину малотоксичні. В пацієнтів з хронічними хворобами гепатобіліарної системи внаслідок їх вживання зменшується, а потім зникає біль в області печінки, минають диспепсичні явища, метеоризм, запор, відчуття важкості у надчеревній ділянці тощо. Препарати цмину застосовують не тільки при запальних процесах у жовчних шляхах,

а й при хронічному гепатиті та цирозі печінки. Препарати цмину не дають побічних реакцій навіть при тривалому застосуванні [37].

У народній медицині відвар і настій суцвіть цмину піскового застосовують при жовтяниці, різних захворюваннях печінки, сечового міхура та сечовивідних шляхів, хворобах травного каналу, особливо при коліті у дітей. Цмин використовують як ефективний засіб для лікування нирковокам'яної хвороби, захворювань нирок і сечового міхура, набряків та для полегшення стану при утрудненому і болісному сечовипусканні. Відвар цмину вживають також при запаленні сідничного нерва та невралгії [4].

## 1.2 Ботанічна характеристика безсмертника приквіткового

Безсмертник приквітковий завдяки культивуванню має досить велике поширення в Україні. Це рослина з великими білими, жовтими, оранжевими, темно-червоними суцвіттями, являє собою однорічні та багаторічні трав'янисті рослини та кущі, заввишки в середньому 60-90 см.

Це трав'яниста, багаторічна рослина, яка відносяться до роду Цмин (*Helichrysum*), триби (*Gnaphalieae*), підродини Айстрові (*Asteroideae*), родини Айстрові (*Asteraceae*), порядку айстроцвіті (*Asterales*), класу Дводольні (*Magnoliopsida*), відділ покритонасінні, або квіткові рослини (*Magnoliophyta*).

Безсмертник приквітковий вперше був описаний французьким дослідником – ботаніком Етьєном П'єром Вентенатом, у 1803 році [107]. У своїй роботі він вказав цю рослину під назвою *Xeranthemum bracteatum*.

Опис цієї рослини увійшов до книги «Jardin de Malmaison», яку замовила дружина Наполеона Жозефіна де Богарне. Це був каталог рідкісних на той час рослин, які вона збирала і вирощувала в своєму маєтку Шато-де-Мальмезон. В оранжереях і теплицях вона зібрала велику колекцію з екзотичних рослин з усього світу, багато з яких стали відомі в Європі завдяки їй. Латинська назва *bracteatum* означає паперові приквітки суцвіть, які часто помилково називали пелюстками.



Рис. 1.1 Фрагмент з книги «Jardin de Malmaison» [107]

Пізніше англійський ботанік Генрі Чарльз Ендрюс у 1805 році переніс безсмертник приквітковий до роду *Helichrysum* на основі морфології квітколожа [82]. Німецький ботанік Лев Віктор Фелікс Хенкель фон Доннерсмарк описав його як *Helichrysum lucidum* у 1806 році, а французький ботанік Християн Генріх Персон – як *Helichrysum chrysanthum* у 1807 році.

Назву *Helichrysum bracteatum* рослина мала протягом багатьох десятиліть, але в 1990 році російський ботанік, академік Микола Миколайович Цвелєв позначив і розмістив безсмертник приквітковий в новий, монотипичний рід *Xerochrysum*. Ця назва була утворено з грецьких слів: *Ксерос* - «сухі» і *хризма* - «золоті». Згідно з класифікацією Цвелєва М.М., *Xerochrysum* - невеликий рід, що має шість видів [70]. При цьому типовим видом є *Xerochrysum bracteatum*.

Проте в 1991 році безсмертник приквітковий отримав назву *Bracteantha bracteata* коли шведські ботаніки Арне Андерберг і Лорі Хегі перенесли *Helichrysum*

*bracteatum* у новий рід *Bracteantha* та відзначили *Bracteantha bracteata* як типовий вид цього роду [81]. Плутанина в назві роду існувала протягом десятиліть і продовжується в даний час. Проте в літературі найчастіше згадуються родові назви і *Xerochrysum* і *Helichrysum*. З 2002 року в садівничій та агрономічній літературі назва *Xerochrysum* є пріоритетною. Проте в науковій ботанічній літературі традиційно використовується виключно родова назва *Helichrysum*. До роду *Xerochrysum* відносяться наступні види: *Xerochrysum bicolor*, *Xerochrysum papillosum*, *Xerochrysum subundulatum*, *Xerochrysum viscosum*, *Xerochrysum palustre*, *Xerochrysum bracteatum* [69].

При аналізі морфологічних ознак окремих видів цього роду можна зробити припущення, що ми маємо справу з видовим комплексом. Тобто, в межах цього роду окремі види мають нечіткі відмінності та ретельне дослідження морфологічних ознак не дають чіткого уявлення про особливості кожного виду. На користь цього припущення може бути використаний факт того, що немає у цих видів репродуктивної ізоляції. Практично для рослин роду *Helichrysum* (*Xerochrysum*) природним ареалом розповсюдження є Австралія і Тасманія. Крім спільного ареалу розповсюдження, загальними є також запилюючі комахи, тому можна зробити припущення про природне гібридне видоутворення, яке відбувається і зараз.

Дуже активно проводиться штучне гібридне видоутворення, але вже у вигляді цілеспрямованої селекції нових сортів. При цьому метою є: нове забарвлення приквітників, стійкість до захворювань і до несприятливих умов вирощування, розмір суцвіть та тривалість цвітіння.

*Helichrysum bracteatum* (*Xerochrysum bracteatum*), безсмертник приквітковий багаторічник, зустрічається в усіх континентальних штатах Австралії. Росте від вологих лісів до пустель і гірських територій. Широке поширення має в Північному Квінсленді в Західній Австралії. Зростає як однорічна в Центральній Австралії, максимально використовуючи сезон опадів, щоб завершити свій життєвий цикл. Росте на сухих піщаних і супіщаних, а також на кам'янистих ґрунтах [91]. Рослина дуже чутлива до вологи і інсоляції, менш чутлива до якості ґрунту. Широко культивується в європейських країнах: у Німеччині, Франції, Нідерландах.

Безсмертник приквітковий є об'єктом селекції нових сортів, які відрізняються кольором приквітників, розміром суцвіть, періодом і тривалістю цвітіння.

Безсмертник приквітковий активно культивується в Україні. Рослина досить невибаглива, на накопичення біологічно активних речовин в більшій мірі впливає висока інсоляція і волога, та в меншій мірі ґрунт. Культивування рослини не витратне, не має вимог до ґрунту і до кліматичного поясу.

Стебло пряме, злегка ребристе, іноді буває розгалуженим біля основи. Верхня частина стебла розгалужена, стебла грубі, міцні і покриті тонкими волосками, вони міцніші в порівнянні з стеблами інших представників цього роду. Ступінь розгалуження залежить від умов зростання, на відкритих ділянках розгалуження сильніше, довжина стебла від 20 до 100 см.

Листя чергове, вузьке, ланцетоподібне, еліптичне, зворотньо-ланцетоподібне, від 1,5 до 10 см завдовжки і від 0,5 до 3 см завширшки, листя опушені дрібними волосками. Колір стебла і листя світло зеленого кольору. Коренева система мичкувата. Довжина і розгалуженість кореневої системи варіюється від виду ґрунту і має довжину від 10 до 25 см.

Суцвіття круглі, знаходяться на верхівці стебла, розмір від 2 до 7 см, яскраво забарвлені, колір залежить від виду і сорту рослини. Як і у всіх представників родини *Asteraceae*, суцвіття складається з центрального диска, в якому знаходяться окремі квітки, вони знаходяться прямо, в проекції потовщеної частини стебла. Навколо диска суцвіття знаходиться обгортка з модифікованого листя і приквітників. Розташовані декількома рядами приквітники скручуються і оточують квітки в суцвітті, при цьому створюють блискучий кольоровий віночок навколо квіток. Приквітники складаються з відмерлих клітин, які мають тонку первинну і товсту вторинну клітинну стінку. Ці клітини характерні тільки для приквітників і не зустрічаються в будові інших частин рослини. Колір приквітників залежить від наявності в них пігментів, які різні в залежності від виду рослини.

Квітки жовтого кольору, на зовнішньому колі диска суцвіття зосереджені одностатеві, жіночі квітки, які не мають тичинок. Жіночі квітки мають короткий

трубчастоподібний віночок навколо маточки, який розщеплюється на дві приймочки. У центрі суцвіття, в проекції стебла, знаходяться двостатеві квітки, які мають довший віночок і п'ять тичинок, з'єднаних у пиляках, і маточку в центрі з однією сім'ябрунькою. Плід – сім'янка, гладкий, коричневий, довжиною 2 - 3 мм, має щетинки.

Найбільш розповсюджені сорти *Helichrysum bracteatum* в Європі та Австралії:

«*Dargan Hill Monarch*». Цей сорт був природною формою *Xerochrysum bracteatum*, який поширений на півдні Квінсленда. Це невисокий багаторічник, який утворює чагарник заввишки від 60 до 80 см, і до 1,5 м завширшки. Стебло і листя сіро-зеленого кольору, сильно опушені, суцвіття золотисто-жовтого кольору 7-9 см у діаметрі. Найкраще росте на відкритому сонці і при рясному поливі.

«*Cockatoo*». Сорт утворився в штаті Вікторія, як спонтанний гібрид між «*Dargan Hill Monarch*» і багаторічною формою *Xerochrysum bracteatum* з білими суцвіттями. Це густа багаторічна рослина, яка розростається в чагарник, що досягає близько 1 м у висоту і ширину. Ланцетні листки мають довжину від 6 до 12 см і густо вкриті тонкими волосками, які надають їм сіруватий відтінок. Стебла також покриті тонкими волосками. Суцвіття мають світлі лимонно-жовті приквітки і помаранчеві диски і з середнім діаметром 7 см. Суцвіття знаходяться на квітконосах, довжиною 12-15 см.

«*Golden Bowerbird*» – це гібрид, отриманий шляхом зворотного схрещування сорту «*Cockatoo*» з сортом «*Dargan Hill Monarch*». У цього сорту набагато більше суцвіття, ніж у обох батьків, але при цьому менше стебло, яке досягає 40 см у висоту. Суцвіття досягають 9-10 см у діаметрі. У них близько 300 приквітників на кожному суцвітті, в порівнянні з 80 у «*Dargan Hill Monarch*» і 200 у «*Cockatoo*», що надає їм «подвійний» вид.

«*Princess of Wales*» – це спонтанний гібрид, що утворився в результаті схрещування сорту «*Dargan Hill Monarch*» і однорічної форми. Ця форма досягає 60 см у висоту і ширину, має невелике листя. На відміну від свого батьківського «*Dargan Hill Monarch*», у його листків є волоски тільки на середній жилці на нижньому боці листової пластинки. Цвіте дуже рясно, має великі суцвіття золотисто-жовтого

кольору, діаметром 6 см, які розташовані на квітконосах на 5-9 см над листям. На відміну від інших форм, стебла в'януть і вмирають природним чином після цвітіння, поступаючись місцем новим паросткам і квіткам.

«*Diamond Head*» – це природна форма *Xerochrysum bracteatum*, зібрана в Новому Південному Уельсі, де вона досить часто зустрічається на обривах і скелях. Виростає на відкритих ділянках як невисокий, багаторічний чагарник висотою 80 см і 60 см у діаметрі. Суцвіття жовтого кольору 3 см в діаметрі з помаранчевим диском.

«*Hasting Gold*» є природної формою *Xerochrysum bracteatum*, виростає на місі Гастінгс на схід від узбережжя Нового Південного Уельсу. Це багаторічні рослини, що утворюють чагарники із зеленим густим листям. Золотисто-жовті суцвіття мають розмір близько 5 см у діаметрі і виносяться квітконосами на 20 см над листям. Сорт за розмірами менший ніж «*Dargan Hill Monarch*» і більший ніж «*Diamond Head*» [83].

Найпоширеніші сорти безсмертника приквіткового, які представлені в Україні:

*Файербаль*. Рослина до 115 см заввишки, стебло пряме, листя ланцетоподібне, лінійне. Суцвіття опукле, 5 - 6 см у діаметрі, оточені багаторядною обгорткою приквітників. Колір обгортки червоний з коричневим відтінком. Час цвітіння – з липня по серпень.

*Віолетт*. Рослина до 110 см заввишки, суцвіття 4 - 6 см. Обгортка приквітників багаторядна, темно-червоного кольору з фіолетовим відтінком. Час цвітіння – з липня по вересень.

*Уайт*. Рослина висотою до 110 см, стебло пряме, листя ланцетоподібне. Діаметр суцвіть – до 6,5 см. Обгортка багаторядна, приквітники білі, плівчасті. Цвіте рослина з липня по вересень.

*Іеллоу*. Рослина до 105 см заввишки, листя зворотне ланцетоподібне, витягнуте. Суцвіття до 4 - 6 см у діаметрі, обгортка приквітників плівчаста, золотисто-жовтого кольору. Час цвітіння – липень, серпень.

Найчастіше в Україні зустрічається сорт безсмертника приквіткового *Файербаль*, тому основним об'єктом фармакогностичних досліджень використовували даний сорт.

### 1.3 Хімічний склад безсмертника приквіткового

Згідно аналізу літературних джерел, системного дослідження класів хімічних сполук безсмертника приквіткового практично немає.

У результаті дослідження було виділено зі спиртового екстракту квіток *Helichrysum bracteatum* та ідентифіковано ряд сполук фенольної структури: брактеїн, ауреузидин, лютеолін, цинарозид [105].

Згідно іншого дослідження, було виявлено ряд сполук: субсканденин (5,7-дигідрокси-8,4-диметоксифлаванон); прунін, флаваноногий глікозид, агліконовою формою якого є нарінгенін; еріодиціол (5-O- $\beta$ -D-глюкопіранозид); піракантозид; кверцетин; лютеолін; хризоеріол; ізо-орієнтин; кофейна кислота; піперитол та 4-гідроксиметил-1-метоксикарбонілазулен [84].

Також у траві безсмертника приквіткового виявлено гіспідулін (4',5,7-тригідрокси-6-метоксифлаванон) та було досліджено його аналгетичну і протизапальну активність за допомогою різних культур тканин. Відомо, що гіспідулін має антиоксидантну, протигрибкову, протизапальну, антимуутагенну та протипухлинну властивості, та є дуже перспективною сполукою для розробки нових лікарських засобів [97].

З огляду на велике розповсюдження і значну сировинну базу Безсмертник приквітковий є дуже перспективною рослиною для всебічного фармакогностичного вивчення.

### 1.4 Дослідження біологічної активності та застосування безсмертника приквіткового

*Helichrysum bracteatum* широко використовується у флористиці для створення квіткових композицій і букетів, завдяки властивості зберігати колір суцвіть при висушуванні. Також рослина широко використовується для озеленення територій і створення елементів ландшафтного дизайну.



Проводилось дослідження антиоксидантної та протизапальної активності екстрактів квіток безсмертника приквіткового. Як екстрагент використовувалися: вода, 50 % і 95 % етанол, 50 % і 100 % бутиленгліколь. Антиоксидантна активність досліджувалась за допомогою використання ДФПГ-тесту на основі 2,2-дифеніл-1-пікрилгідразилу. Протизапальна активність оцінювалась *in-vitro* методом впливу на експресію запальних біомаркерів, викликаних УФ-випромінюванням. У результаті дослідження встановлено, що антиоксидантна активність та протизапальна дія була притаманна для всіх екстрактів, але найвища активність – спиртового (50 %) екстракту квіток безсмертника приквіткового [87]. Водний екстракт квіток безсмертника приквіткового досліджувався як перспективне джерело барвників для тканин. Це продиктовано як з точки зору необхідності пошуку джерела екологічно чистих барвників без впливу на навколишнє середовище, так і з точки зору безпеки для людини при використанні пофарбованих тканин. У цьому ж дослідженні аналізувалася антимікробна активність по відношенню до *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi*. У результаті дослідження було підтверджено наявність флавоноїдів - брактеїна і цернуозида за допомогою хроматографії на папері і УФ-спектрофотометрії. Та завдяки наявності брактеїна і цернуозида, екстракт квіток забезпечує можливість якісного фарбування тканин. Також екстракт квіток безсмертника проявляє бактерицидну дію до *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Salmonella typhi*, яку досліджували методом колодязів на поживному середовищі [94].

## Висновки до розділу 1

Попереднє вивчення літературних джерел показало, що рослини роду Цмин (*Helichrysum*) є досить різноманітними, як з точки зору розповсюдженості так і за різноманітним вмістом біологічно активних речовин. Деякі рослини роду Цмин вже зараз використовуються у вітчизняній та народній медицині різних країн світу в як лікарські засоби при хронічних запальних захворюваннях печінки, жовчного міхура та жовчних шляхів. У народній медицині цмин застосовується для лікування

нирковокам'яної хвороби, хвороб нирок і сечового міхура, набряків, а також для полегшення стану при утрудненому і болісному сечовипусканні.

Після узагальнення результатів досліджень хімічного складу і фармакологічних ефектів видів роду Цмин, які проводились вітчизняними та іноземними фахівцями, можна зробити висновок, що види цього роду досліджені недостатньо. При цьому найбільш вивченим є тільки один вид - цмин піщаний, який застосовується тільки при захворюваннях гепатобіліарної системи. Але потенціал рослин цього роду використаний далеко не повністю. З урахуванням того, що на сучасному етапі розвитку фармацевтичної галузі та медицини в цілому є необхідність у розширенні сировинної бази для виробництва лікарських засобів, перш за все, на основі лікарської рослинної сировини, є нагальна потреба в проведенні подальшого поглибленого фармакогностичного аналізу та фармакологічних досліджень екстрактів та інших субстанцій, одержаних на основі різних видів рослин роду Цмин. З огляду на різноманітність біологічно активних речовин та широку сировинну базу, рослини роду Цмин повинні бути вивчені більш ретельно.

До цього часу проводяться дискусії щодо родової приналежності безсмертника приквіткового. Були наведені обидві класифікації та оцінено використання кожної з них.

Безсмертник приквітковий в Україні застосовується у флористиці, як елемент ландшафтного дизайну. Проте, даний вид є невивченим з точки зору фармакогностичного аналізу. З огляду на широку сировинну базу, є актуальним всебічне фармакогностичне вивчення цієї рослини. Крім того, результати попередніх досліджень рослин роду Цмин надають впевненість у перспективності їх вивчення. Слід відзначити, що фенольні сполуки, які характерні для рослин роду Цмин, вказують на перспективність цих рослин, насамперед, у створенні лікарських препаратів з антимікробною, протизапальною та антиоксидантною активністю. Лікарські засоби з даними видами є дуже необхідними в сучасній медицині. З огляду на це безсмертник приквітковий є перспективною рослиною для всебічного фармакогностичного вивчення.

## РОЗДІЛ 2

### ОБ'ЄКТИ ТА МЕТОДИКИ ДОСЛІДЖЕНЬ

#### 2.1 Відомості про об'єкти дослідження, прилади, методики та реактиви

Об'єктами для проведення досліджень були трава, квітки та корені безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*) сорту «Файербаль».

Для дослідження використовували проби сировини, яким присвоювали номери серій. Усі серії були заготовлені в Харківській області. Заготівлю проводили на фармакопейних ділянках ботанічного саду Національного фармацевтичного університету м. Харків та у приватному господарстві в Зміївському районі.

Номери серії та місце заготівлі представлено у таблиці 2.1. Сировину заготовляли в період масового цвітіння (липень – серпень 2017 – 2019 рр.).

Таблиця 2.1

#### Серії, дата та місце заготівлі сировини

Зразок	Номер серії	Дата заготівлі	Місце заготівлі сировини
1	10717	Липень 2017	Ботанічний сад НФаУ
2	20817	Серпень 2017	Ботанічний сад НФаУ
3	30718	Липень 2018	Приватне господарство в Зміївському районі, Харківській області
4	40719	Липень 2019	Ботанічний сад НФаУ
5	50819	Серпень 2019	Приватне господарство в Зміївському районі, Харківській області

Після заготівлі сировину приводили до стандартного стану: видаляли помилково зібрані нетоварні частини рослини, видаляли різні домішки та висушували до «повітряно-сухого стану» згідно до вимог GACP.

При здійсненні досліджень використовували хімічні, фізичні, фізико-хімічні та технологічні методи дослідження.

Для частини етапів виконання роботи застосовували макро- мікроскопічні та мікробіологічні методи вивчення.

Отримані експериментальні дані обробляли методами варіаційної статистики (вираховували середнє арифметичне та його стандартну похибку). Для множинних порівнянь даних з нормальним розподілом проводили параметричний однофакторний дисперсійний аналіз ANOVA та застосовували метод Н'юмена-Кейлса, дані представляли як середню ( $M$ ) та похибку середньої ( $m$ ). В інших випадках використовували порівняння вибірок за допомогою критерію Мана-Уїтні [17]. Відмінності між експериментальними групами вважали статистично значущими при  $p < 0,05$ .

Для проведення математичних розрахунків застосовували стандартний пакет статистичних програм „Statistica, v. 6,0” (StatSoft inc. USA) [68].

При виконанні дисертаційної роботи були використані відомі методи виявлення якісного складу і кількісного визначення основних БАР. Використовували тонкошарову (ТШХ), хроматографію на папері (ПХ), газову хроматографію з мас-детектором (ГХ/МС) та високоефективну рідинну хроматографію (ВЕРХ).

Для проведення ТШХ використовували хроматографічні пластинки «Silufol» та «Sorbfil», для ПХ використовували хроматографічний папір «Filtrak».

Оптичну густину досліджуваних розчинів вивчали на спектрофотометрах Mecasys Optizen POP та Evolution 60S, при цьому застосовували кювети з товщиною шару 10 мм [19, 20, 21, 32].

Для проведення якісних реакції на різні групи біологічно активних сполук та подальшого хроматографічного аналізу використовували водні та спиртові екстракти трави та квіток безсмертника приквіткового.

Мінеральний склад сировини визначали методом атомно-емісійної спектрофотометрії.

## 2.2 Ідентифікація та визначення вмісту біологічно активних речовин у сировині безсмертника приквіткового

### 2.2.1 Дослідження фенольних сполук

Хроматографічний аналіз фенольних сполук проводили з використанням ПХ і ТШХ. Для цього використовували хроматографічний папір «Filtrak», хроматографічні пластинки «Silufol» та «Sorbfil». При проведенні хроматографії використовували наступні системи розчинників: 15 % і 30 % оцтова кислота, бутанол–оцтова кислота–вода (4:1:5), (3:1:1), оцтова кислота–хлористоводнева кислота–вода (30:3:10).

Для аналізу використовували спиртовий екстракт трави безсмертника приквіткового. Наважку подрібненої сировини 3,0 г (точна наважка), яка проходить крізь сито з отворами 1 мм поміщали в колбу 250 мл, додавали 100 мл етанолу 70 %, до колби приєднували повітряний холодильник та екстрагували, перемішуючи на киплячій водяній бані впродовж 60 хв. Після екстракції охолоджену витяжку фільтрували крізь складчастий паперовий фільтр у мірну колбу місткістю 200 мл.

Для ідентифікації фенольних сполук в УФ – світлі використовували такі реактиви: розчин аміаку, 10 % розчин натрію гідроксиду, 2 % розчин цирконію хлористого. Речовини ідентифікували за хроматографічними характеристиками (показниками  $R_f$ , флуоресценцією, забарвленням плям до і після обробки реактивами), у порівнянні з достовірними зразками [35, 36, 39, 93].

### 2.2.2 Дослідження флавоноїдів

Аналіз складу флавоноїдів здійснювали методом ВЕРХ. Наважку сировини кожної проби 0,3-0,6 г екстрагували в 5 мл етанолу 70 % на ультразвуковій бані при 80 °С впродовж 5 год у скляних герметичних віалах із тефлоновою кришкою.

Отримані екстракти центрифугували при 3000 об/хв та фільтрували крізь одноразові мембранні фільтри з порами 0,22 мкм.

Хроматографію проводили на рідинному хроматографі Agilent Technologies 1200. В якості рухомої фази використовували ацетонітрил (А) та 0,1 % розчин мурашиної кислоти в воді (В). Елюювання проводили в градієнтному режимі: 0 хв – А (30 %) : В (70 %); 20 хв – А (70 %) : В (30 %); 22 хв – А (100 %) : В (0 %); 30 хв – А (100 %) : В (0 %). Розділення проводили на хроматографічній колонці Zorbax SB-C18 (3,5 мкм, 150 x 4,6 мм) (Agilent Technologies, USA), швидкість потоку крізь колонку 0,25 мл/хв., температура термостата 30 °С, об'єм інжекції 4 мкл. Детекцію проводили з використанням діодно-матричного детектора з реєстрацією сигналу при 280 та 365 нм та фіксацією спектрів поглинання в діапазоні 210–700 нм [96].

Ідентифікацію та визначення вмісту проводили з використанням стандартних розчинів флавоноїдів (лютеоліну, рутину, кверцетин-3-О-β-D-глікозиду, нарінгіну, неогесперідину, кверцетину, нарінгеніну).

### 2.2.3 Визначення вмісту суми флавоноїдів

Для визначення вмісту суми флавоноїдів у сировині безсмертника приквіткового був використаний метод спектрофотометричного аналізу у перерахунку на лютеолін-7-О-β-D-глюкозид з додаванням алюмінію хлориду в середовищі розведеної кислоти оцтової. Аналіз заснований на хімічній взаємодії флавоноїдів з алюмінію хлоридом з утворенням забарвлених продуктів - хелатних комплексів. При цьому відбувається батохромний зсув, коли максимум поглинання першої смуги зміщується на 35-50 нм до видимої області в порівнянні з вихідним флавоноїдом [34]. Додавання кислоти оцтової руйнує нестабільні комплекси в орто-гідроксигрупах, а існуючі комплекси між карбонільною групою при С4 і гідроксильними групами при С3 і С5 залишаються стабільними. У досліджуваних спиртових витягів безсмертника приквіткового трави та квіток максимум поглинання при додаванні алюмінію хлориду у середовищі розведеної кислоти оцтової

визначався при 400 нм. Було з'ясовано, що максимум поглинання для комплексу ДСЗ лютеолін-7-О-β-D-глюкозиду (цинарозиду) з алюмінію хлоридом в середовищі розведеної кислоти оцтової є аналогічним [1, 9].

Точну наважку сировини подрібненої до розміру часток 2 мм, поміщали в колбу з шліфом місткістю 150 мл, додавали 25 мл етанолу 70 % колбу приєднували до зворотного холодильника і нагрівали на киплячій водяній бані протягом 30 хвилин. Після охолодження колби до кімнатної температури, вміст фільтрували крізь паперовий фільтр у мірну колбу місткістю 100 мл. Далі зазначеним вище способом екстракцію повторювали ще 3 рази тим же екстрагентом. Витяжки фільтрували в ту ж мірну колбу, обсяг доводили до мітки етанолом 70 %. Потім проводили ціанідінову пробу для підтвердження повноти вилучення флавоноїдів.

У мірну колбу місткістю 25 мл поміщали 2,5 мл отриманого екстракту, додавали 5 мл 5 % розчину алюмінію хлориду в етанолі 96 % і 2 краплі розведеної кислоти оцтової. Обсяг розчину доводили етанолом 96 % до позначки і залишали на 45 хвилин. Оптичну густину отриманого розчину вимірювали на спектрофотометрі Evolution 60S за довжини хвилі 400 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм. Як розчин порівняння використовували розчин, що складається з 2,5 мл витяжки, 2 крапель розведеної кислоти оцтової, і доводили етанолом 96 % до позначки в мірній колбі місткістю 25 мл. З метою перерахунку вмісту суми флавоноїдів на цинарозид був використаний питомий показник поглинання, взятий з літературних джерел. Відповідно до довідникових даних питомий показник поглинання комплексу розчину ДСЗ цинарозиду з алюмінію хлоридом за довжини хвилі 400 нм становить  $145,0 \pm 2,3$ . Тому в формулу розрахунку включено теоретичне значення  $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 145$  [53].

Розрахунок отриманих результатів здійснювали за формулою 2.1:

$$X = \frac{A_x \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100}{E_{1\text{cm}}^{1\%} \cdot m \cdot V_a \cdot (100 - W)}, \quad 2.1$$

де  $A_x$  – оптична густина дослідженого розчину;

$V_1$  та  $V_2$  – розведення досліджуваних розчинів, мл;

$E_{1\text{см}}^{1\%}$  – питомий показник поглинання стандартного розчину цінарозиду, який дорівнює 145, за довжини хвилі 400 нм;

$m$  – наважка досліджуваної сировини, г;

$W$  – втрата в масі при висушуванні сировини;

$V_a$  – об'єм аліквоти, мл.

#### 2.2.4 Дослідження фенолкарбонових кислот

Для ідентифікації та визначення вмісту фенолкарбонових кислот готували витяжки із безсмертника приквіткового трави і квіток екстракцією етанолом 50 % у співвідношенні сировини-екстрагент 1: 5. Для виявлення фенолкарбонових кислот у досліджуваних об'єктах, витяжки піддавали хроматографічному аналізу із застосуванням ПХ і ТШХ (папір марки «Filtrak», хроматографічні пластинки марки «Silufol», «Sorbfil»). На хроматограми наносили мікропіпеткою 0,01 мл витяжки досліджуваних зразків рослинної сировини. Аналіз проводили в наступних системах розчинників: бутанол–оцтова кислота–вода (4:1:2), оцтова кислота 2 % і 15 %. Хроматограми досліджували в УФ–світлі до і після обробки специфічними реактивами. Фенолкарбонові кислоти виявляли за специфічною флюоресценцією в УФ–світлі (365 нм) з використанням відповідних реактивів і в порівнянні з вірогідними зразками.

Для ВЕРХ аналізу наважку сировини кожної проби 0,4-06 г, екстрагували в 5 мл 60 % розчину метанолу на ультразвуковій бані при 80 °С впродовж 4 год у скляних герметичних віалах з тефлоновою кришкою. Отриманий екстракт центрифугували при 3 тис об/хв та фільтрували крізь одноразові мембранні фільтри з порами 0,22 мкм.

Дослідження проводили на рідинному хроматографі Agilent Technologies 1200. В якості рухомої фази використовували метанол (А) та 0,1 % розчин мурашиної кислоти в воді (В). Елюювання проводили в градієнтному режимі: 0 хв – А (25 %) : В (75 %); 25 хв – А (75 %) : В (25 %); 27 хв – А (100 %) : В (0 %); 35 хв – А (100 %) : В



(0 %). Розділення проводили на хроматографічній колонці Zorbax SB-Aq (4,6 мм±150 мм, 3,5 мкм) (Agilent Technologies, USA), швидкість потоку крізь колонку 0,5 мл/хв., температура термостату 30 °С, об'єм інжекції 4 мкл.

Детекцію проводили з використанням діодно-матричного детектора з реєстрацією сигналу при 250 та 275 нм та фіксацією спектрів поглинання в діапазоні 210-700 нм [104].

Ідентифікацію та визначення вмісту проводили з використанням стандартних розчинів фенольних сполук (галової, гідроксифенілоцтової, хлорогенової, кофейної, сирінгової, п-кумарової, транс-ферулової, синапової, коричної та хінної кислот).

### 2.2.5 Дослідження органічних кислот

Ідентифікацію та визначення вмісту органічних кислот у сировині проводили методом ВЕРХ. Для проведення аналізу наважку сировини кожної проби 0,6-1,0 г екстрагували в 10 мл 0,1 % розчину  $H_3PO_4$  на ультразвуковій бані при 80 °С впродовж 4 год у скляних герметичних віалах із тефлоновою кришкою. Отриманий екстракт центрифугували при 3 тис об/хв та фільтрували крізь одноразові мембранні фільтри з порами 0,22 мкм.

Дослідження проводили на рідинному хроматографі Agilent Technologies 1200. В якості рухомої фази використовували ацетонітрил (А) та 0,1 % розчину  $H_3PO_4$  в воді (В) (1: 99). Елюювання проводили в ізократичному режимі. Розділення проводили на хроматографічній колонці Zorbax SB-Aq (4,6 мм±150 мм, 3,5 мкм) (Agilent Technologies, USA), швидкість потоку крізь колонку 0,5 мл/хв., температура термостату 30 °С, об'єм інжекції 3 мкл. Детекцію проводили з використанням діодно-матричного детектора, з реєстрацією сигналу при 210 нм та фіксацією спектрів поглинання в діапазоні 210-700 нм [108].

Ідентифікацію та визначення вмісту проводили з використанням стандартних розчинів дикарбонових сполук (винної, пірвіноградної, ізолимонної, лимонної, бурштинової, яблучної кислот).

## 2.2.6 Аналіз вуглеводів

Визначення вільних та зв'язаних моносахаридів у рослинній сировині проводили методом газової хроматографії з мас-спектрометричним детектором (ГХ/МС). Цей метод заснований на вилучення вільних моносахаридів, кислотному гідролізі при визначенні загальних моносахаридів та одержання їх альдонітрильно-ацетатних похідних з подальшим аналізом.

Хроматографічне розділення проводили на газовій хромато–мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973inert (Agilent Technologies, USA). Колонка капілярна HP-5ms (30m×0,25mm×0,25µm, Agilent Technologies, USA). Температура випаровувача 250 °С, температура інтерфейсу 280 °С. Розділення проводили в режимі програмування температури – початкову температуру 160 °С витримували впродовж 8 хв, піднімали з градієнтом 5 °С/хв до 240 °С. Кінцеву температуру витримували впродовж 6 хв. Пробу об'ємом 1 мкл вводили в режимі поділу потоку 1: 50. Детектування проводили в режимі SCAN в діапазоні (38-400 m/z). Швидкість потоку газу носія крізь колонку 1,2 мл/хв.

Рослинну сировину перетирали до порошкоподібного стану в скляній ступці. Наважку сировини 500 мг поміщали в круглодонну колбу, додавали етанол 80 % з внутрішнім стандартом із розрахунку 500 мкг на пробу. Екстракцію вільних моносахаридів проводили на водяній бані при 100 °С з використанням зворотного холодильника впродовж 2 год. Для отримання альдонітрильних похідних моносахаридів відбирали 2 мл екстракту, упарювали досуха на роторному випаровувачі та додавали 0,3 мл дериватизуючого реактиву (32 мг/мл гідроксиламіну солянокислого в суміші піридин/метанол (4:1 v/v)).

Екстракт витримували впродовж 25 хв при 75 °С. Для ацетилювання альдонітрильних похідних моносахаридів додавали 1 мл оцтового ангідриду та витримували впродовж 15 хв при 75 °С. До реакційної суміші додавали 2 мл дихлоретану, надлишок дериватизаційних реагентів видаляли подвійною екстракцією 1N розчином хлористоводневої кислоти та води очищеної. Дихлоретановий шар

висушували досуха та розчиняли в 300 мкл суміші гептан/етилацетат (1:1 v/v). Ідентифікацію моносахаридів досліджуваної суміші проводили за часом утримування стандартів моносахаридів з використанням бібліотеки мас-спектрів NIST 02. Кількісний аналіз проводили шляхом додавання розчину внутрішнього стандарту до досліджуваних проб. Як внутрішній стандарт використовували розчин сорбітолу. За звичайних умов дериватизації кетовуглевод (фруктоза) переходить в альдотуглевод (глюкозу). За даної методики фруктоза при дериватизації дає 2 піки, які під час обрахунків сумують [52, 80, 92].

Вміст моноцукрів (X, мг/г) розраховували за формулою:

$$X = \frac{S_x \cdot m_{\text{внст}} \cdot V_{\text{роз}} \cdot 1000}{S_{\text{вст}} \cdot m \cdot V_{\text{екстр}}}, \quad (2.2)$$

де  $m_{\text{внст}}$  – маса внутрішнього стандарту на пробу, мг;

$m$  – наважка препарату, мг;

$V_{\text{роз}}$  – об'єм розчинника для екстракції, мл;

$V_{\text{екстр}}$  – об'єм екстракту для дериватизації, мл;

$S_x$  – величина площі піку досліджуваної сполуки;

$S_{\text{вст}}$  – величина площі піку внутрішнього стандарту.

### 2.2.7 Дослідження летких сполук

Для проведення аналізу летких сполук рослинну сировину (5-10 г) перетирали до порошкоподібного стану. Додавали 300 мл води та переганяли з зворотним холодильником при температурі 100 °С впродовж 3 год, потім екстрагували дихлорметаном. Екстракт упарювали до 100-200 мкл у тоці азоту.

Аналіз проводили на хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N/5973 inert (Agilent Technologies, USA). Колонка капілярна HP-5MS, довжина 30 м, внутрішній діаметр 0,25 мм, товщина нерухомої фази 0,25 мкм. Розділення

проводили в градієнтному режимі. Початкова температура 50 °С витримувалась впродовж 5 хв з наступним градієнтом 40 С/хв до 220 °С, градієнт 10 °С до 300 °С – витримували впродовж 10 хв, газ–носії гелій, швидкість потоку через колонку 1,0 мл/хв. Температура випаровувача 300 °С, режим вводу проби з поділом потоку (split) з коефіцієнтом 1: 50, об'єм інжекції 2 мкл [71]. Ідентифікацію компонентів досліджуваних проб проводили з використанням бібліотеки мас-спектрів NIST 02, WILEY 2007. Ідентифікацію компонентів досліджуваних проб проводили з використанням бібліотеки мас-спектрів NIST 02, з використанням програм для ідентифікації AMDIS и NIST.

### 2.2.8 Дослідження амінокислот

Попередній аналіз якісного складу амінокислот проводили хроматографічним методом. Аналітичну пробу сировини подрібнювали до розміру часток 1-2 мм 10 г подрібненої сировини поміщали в колбу, заливали етанолом 70 % (1:10) і екстрагували на водяній бані. Отриманий екстракт упарювали в вакуумі до стану густого екстракту і наносили на хроматограму. Хроматографічний аналіз проводили методом ПХ на папері «Filtrak» FN-4 в системі розчинників н-бутанол–оцтова кислота–вода (4:1:2). Для проведення порівняння використовували стандартний набір амінокислот (ТУ 6-09-3147-83) у концентрації 0,1 %. Після проходження в системі розчинників, хроматограми обробляли 0,2 % спиртовим розчином нінгідрину в ацетоні і поміщали в сушильну шафу, де висушували при температурі 60-80 °С. Амінокислоти ідентифікували за забарвленням плям і величиною Rf в порівнянні з стандартними зразками [75].

Визначення вмісту амінокислот здійснювали методом ВЕРХ на хроматографі Agilent 1200 (Agilent technologies, USA), хроматографічна колонка Zorbax AAA (150 мм × 4,6 мм, 3 мкм). Хроматографування проводили з використанням мобільних фаз: А - 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, рН 7,8; В - АСN:MeOH: вода очищена (45:45:10, v/v/v), температура термостата колонки 40 °С. Передколонкову дериватизацію амінокислот

здійснювали в автоматичному програмованому режимі з використанням FМОС реагенту 9-флуоренілметоксикарбонілу хлорид (Agilent 5061-3337) і ОРА реагенту о-фталевий альдегід (Agilent 5061-3335). Дериватизовані похідні детектували за допомогою флуоресцентного детектора.

Для визначення вільних амінокислот близько 0,1 г (точна наважка) попередньо подрібненої рослинної сировини безсмертника приквіткового поміщали у віалу, додавали 2 мл водного розчину 1М хлористоводневої кислоти і витримували протягом 3 год при 50 °С на ультразвукової бані. Для визначення суми амінокислот до наважки сировини додавали 2 мл водного розчину 6М хлористоводневої кислоти і поміщали в термостат при 110 °С. Кислотний гідроліз проводили протягом 24 год.

Ідентифікацію досліджуваних амінокислот проводили шляхом порівняння часу утримання піків на хроматограмі випробуваного розчину з часом утримання речовин – стандартів амінокислот на хроматограмі розчину порівняння [95, 102]. Вміст зв'язаних амінокислот визначали шляхом віднімання вмісту вільних амінокислот від загального вмісту. Розрахунок вмісту амінокислот (X, мкг / мг) проводили за формулою:

$$X = \frac{C \cdot V_{\text{розчину}}}{m_{\text{преп}}}, \quad (2.3)$$

де C – концентрація в мкг/мл, отримана з розрахунку хроматограми розчину порівняння і випробуваного розчину;

$V_{\text{розчину}}$  – об'єм розчинника для екстракції, мл;

$m_{\text{преп}}$  – наважка сировини, мг.

### 2.2.9 Дослідження жирних кислот

Вивчення якісного складу та вмісту жирних кислот у безсмертника приквіткового траві та квітках проводили методом ГХ/МС метилових естерів кислот жирних на газовій хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N / 5973inert

(Agilent Technologies, США). Колонка капілярна HP-5ms (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм, Agilent Technologies, США). Температура випарника – 250 °С, температура інтерфейсу – 280 °С. Поділ проводили в режимі програмування температури - початкову температуру 60 °С витримували протягом 4 хв, піднімали з градієнтом 4 °С/хв до 250 °С, витримували 6 хв, з градієнтом 20 °С піднімали до 300 °С, витримували 5 хв.

Підготовка проби для аналізу: рослинну сировину подрібнювали до порошкоподібного стану в скляній ступці. Наважку препарату 500 мг (точна наважка) поміщали в скляну віалу і додавали реакційну суміш (метанол Р –толуол – сульфатна кислота Р (44:20:2) по 3,3 мл на пробу і розчин внутрішнього стандарту в гептані в кількості 1,7 мл. Досліджувану пробу витримували при температурі 80 °С протягом 2 год, охолоджували до кімнатної температури, центрифугували 10 хв при 5000 об/хв. Відбирали 0,5 мл верхньої гексанової фази, що містить метилові естери кислот жирних.

Пробу об'ємом 1 мкл вводили в режимі поділу потоку 1: 20. Детектування проводили в режимі SCAN у діапазоні (38–400). Швидкість потоку газу-носія крізь колонку 1,0 мл/хв. [33, 90]. Ідентифікацію метилових естерів жирних кислот досліджуваної суміші проводили шляхом порівняння часу утримування стандартної суміші метилових естерів кислот жирних (Supelco, США). Для ідентифікації використовували бібліотеку мас–спектрів NIST 02. Визначення вмісту проводили шляхом додавання розчину внутрішнього стандарту в досліджувані проби. Як внутрішній стандарт використовували розчин ундеканової кислоти.

Вміст жирної кислоти (X, мг/г) розраховували за формулою:

$$X = \frac{S_x \cdot m_{\text{вн.ст}} \cdot 1000}{S_{\text{вст}} \cdot m}, \quad (2.4)$$

де  $m_{\text{вн.ст}}$  – маса внутрішнього стандарту на пробу мг;

$m$  – наважка препарату мг;

- $S_x$  – величина площі піку досліджуваної сполуки;  
 $S_{вст}$  – величина площі піку внутрішнього стандарту.

#### 2.2.10 Дослідження мінеральних речовин

Для визначення якісного складу і вмісту мінеральних речовин та загальної золи квіток, трави та коренів безсмертника приквіткового був використаний атомно-емісійний спектрографічний метод, який заснований на випарюванні золи рослин у дуговому розряді, фотографічній реєстрації розкладеного в спектр випромінювання і вимірюванні інтенсивності спектральних ліній окремих елементів.

Підготовка проби для аналізу складалася в обережному обуглюванні рослинного матеріалу при нагріванні в муфельній печі ( $t^\circ$  не більш  $500^\circ\text{C}$ ) з попередньою обробкою проб розведеною сульфатною кислотою. Випарювання проб квіток, трави та коренів рослини проводилося з кратерів графітових електродів у розряді дуги перемінного струму (джерело збудження спектрів типу ІВС-28) при силі струму 16 А й експозиції 60 с. Для одержання спектрів і їхньої реєстрації на фотопластинках використовували спектрограф ДФС-8 з дифракційною решіткою 600 штр/мм і трилінзовою системою висвітлення щілини.

Вимір інтенсивності ліній у спектрах аналізованих проб і градуювальних зразків (ГЗ) проводився за допомогою мікрофотометра МФ-1.

Фотографування спектрів проводили в наступних умовах: сила струму дуги змінного струму – 16А, фаза підпалювання –  $600^\circ\text{C}$ , частота підпалювання імпульсів – 100 розрядів в секунду; аналітичний проміжок – 2 мм, ширина щілини спектрографа – 0,015 мм; експозиція – 60 с [55, 59].

Спектри мінералів фотографували в області довжин хвиль 230-330 нм. За допомогою стандартних проб розчинів солей металів (ІСОПМ-23-27) в інтервалі вимірюваних концентрацій будували градуювальні графіки, за якими відносно кожного елемента визначали вмісту його у золі та обчислювали за формулою:

$$X = \frac{a \cdot m}{M}, \quad (2.5)$$

де  $m$  – маса золи, г;

$M$  – маса сировини/екстракту, г;

$a$  – вміст мінералу в золі, %.

### 2.3 Дослідження антиоксидантних властивостей екстракту трави безсмертника приквіткового

У дослідженні антиоксидантної активності застосовувалася модифікація хемілюмінесцентного методу (ХМ), в якому в якості активатора використовувався люмінол. Цей метод дозволяє визначити загальну кількість вільних радикалів, які пов'язують антиоксиданти в досліджуваному зразку, тобто загальну антиоксидантну ємність (ЗАЄ). Як матеріал для аналізу антиоксидантної активності використовували водний екстракт трави безсмертника приквіткового (1:5). Вихідний розчин: 0,001 М розчин люмінолу (5-аміно-2,3-дигідро-1,4-фталазіндіон), H<sub>2</sub>L («Хемапол», Чехія) готували з препарату перекристалізацією з крижаної оцтової кислоти в присутності активованого вугілля, а відтак – з насиченого розчину лугу за точною наважкою в 0,01 М розчині натрію гідроксиду. В експерименті використовували розчини лугів без карбонатів. Для приготування і підтримання необхідної кислотності середовища використовували 0,1 М розчин натрію гідроксиду, рН розчинів контролювали за допомогою скляного індикаторного електрода ЕСЛ-43-07 і іонометра лабораторного І-130. Усі розчини готували на двічі очищеній воді. Розчин пероксиду водню 5 % (мас.) готували з 50 % -ного препарату розведенням його водою з подальшим контролем концентрації 0,01 М розчином калію перманганату. Використовували гемоглобін крові людини виробництва фірми «Simko Ltd», м. Львів, Україна. Вихідний розчин гемоглобіну 75 мкг/мл готували розчиненням 7,5 мг в 75 мл двічі очищеної води при прогріванні і додаванні 0,5 г натрію дигідрофосфату. Обсяг доводили до мітки двічі очищеною водою при 293 К і перемішували. Робочий розчин



гемоглобіну готували розведенням вихідного двічі очищеною водою точно в 100 разів. Розчин придатний до застосування протягом доби. Інтенсивність хемілюмінесценції вимірювали на хемілюмінометрі 0,1 за допомогою фотоелектронного помножувача ФЕУ-84-А, вимірником малих струмів ІМТ-0,5 і швидкодіючим потенціометром-самописцем. Реакцію, яка супроводжується хемілюмінесценцією, проводили в кварцовій кюветі циліндричної форми діаметром 30 мм з робочим об'ємом 10 мл. При проведенні дослідів дотримувалися такого порядку змішування реагентів: до суми індикатора люмінолу в лужному розчині пероксиду водню (з розчинами досліджуваних речовин або без них), додавали за допомогою піпеткового дозатора П-1 0,50 мл розчину гемоглобіну і реєстрували кінетичну криву інтенсивності хемілюмінесценції ( $I_{хл}$ ) – час (хв). Дозатор поміщений у зйомний тримач, який ізолює фотокатод фотоелектронного помножувача від стороннього світла, що дозволяє працювати при звичайному освітленні. Всі експерименти проводилися при температурі + 18-20°C.

Інгібуючу дію екстракту трави безсмертника приквіткового оцінювали за величиною зменшення (депресії) максимальної інтенсивності хемілюмінесценції (ХЛ) за формулою:

$$\Delta I_{хл} = I_0 - I_{хл}, \quad (2.6)$$

де  $I_0$  – максимальна інтенсивність ХЛ при відсутності екстракту безсмертника приквіткового;

$I_{хл}$  – максимальна інтенсивність ХЛ в присутності екстракту безсмертника приквіткового [8, 12, 13].

#### 2.4 Дослідження антимікробної та протигрибкової дії екстрактів трави та квіток безсмертника приквіткового

Для вивчення антибактеріальних властивостей сировини безсмертника приквіткового виготовляли екстракти з трави і квіток безсмертника приквіткового в

співвідношенні сировина – отриманий екстракт 1:5. Як екстрагент використовували етанол різної концентрації: 40 %, 70 %, 96 % та воду.

Для виключення упередженості, дослідження проводили «сліпим» методом, тому кожен досліджуваний зразок мав свій номер. Екстракція сировини здійснювалась вакуумно-фільтраційним методом при кімнатній температурі (низькотемпературна екстракція). Цей метод дозволяє максимально зберегти структуру фенольних сполук та інших БАР і тим самим забезпечити максимальну фармакологічну активність отриманих екстрактів.

Для дослідження екстрактів були використані еталонні тест-культури грам-позитивних і грам-негативних бактерій, які належать до різних таксономічних груп: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Proteus vulgaris* ATCC 4636. Протигрибкову дію екстрактів досліджено на референтному штамі *Candida albicans* ATCC 885-653. Зазначений набір тест-штамів є загальноприйнятим при первинному визначенні протимікробної дії. Тест-культури було одержано у лабораторії медичної мікробіології з Музеєм мікроорганізмів ДУ “ІМІ ім. І. І. Мечникова НАМН України”. Для отримання більш достовірних та об'єктивних результатів, крім еталонних тест-культур, для дослідження використовувались клінічні штами, які були виділені від пацієнтів в умовах стаціонарного лікування, та, які є клінічно значимими, з урахуванням мутацій та набутої резистентності.

*Staphylococcus aureus* № 33 клінічний штам, виділений від хворої П. 67 років з слизової носових пазух, діагноз – хронічний гайморит. Штам чутливий до цефтриаксону, фортуму, цефалперазону, цефепиму, азитроміцину, гатифлоксацину, левофлоксацину, слабочутливий до амоксиклаву, цефалоспоринів 1-2 покоління, хлорфіліпту. Сильноадгезивний. Лецитиназопозитивний, коагулазопозитивний.

*Staphylococcus aureus* № 45 клінічний штам, виділений від хворої П. 43 років з слизової носових пазух, діагноз – хронічний гайморит. Штам чутливий до цефтриаксону, фортуму, цефалперазону, цефепиму, азитроміцину, гатифлоксацину,

левофлоксацину, слабочутливий до амоксиклаву, цефалоспоринів 1-2 покоління, хлорфіліпту. Сильноадгезивний. Лецитиназопозитивний, коагулазопозитивний.

*Staphylococcus aureus* № 79 клінічний штам, виділений від хворого М. 76 років з слизової оболонки ротової порожнини (мигдалин), діагноз – фолікулярна ангіна. Штам чутливий до цефтриаксону, фортуму, цефалперазону, цефепиму, азитроміцину, гатифлоксацину, левофлоксацину, слабочутливий до цефалоспоринів 1-2 покоління, хлорфіліпту. Середньоадгезивний. Лецитиназопозитивний, коагулазопозитивний

*Escherichia coli* № 77 клінічний штам, виділений від хворої Л. 48 років з слухових проходів, діагноз – гострий отит. Штам чутливий до цефтриаксону, фортуму, цефалперазону, цефепиму, гатифлоксацину, левофлоксацину, ципрофлоксацину, фосфоміцину, фурамагу, слабочутливий до цефалоспоринів 1-2 покоління, офлоксацину, фуразолідону, нітроксоліну. Середньоадгезивний.

*Escherichia coli* № 110 клінічний штам, виділений від хворого З. 64 років з слизової оболонки ротової порожнини (мигдалин), діагноз – фолікулярна ангіна. Штам чутливий до цефтриаксону, фортуму, цефалперазону, цефепиму, азитроміцину, гатифлоксацину, левофлоксацину, слабочутливий до цефалоспоринів 1-2 покоління. Середньоадгезивний.

*Klebsiella pneumoniae* № 102 клінічний штам, виділений від хворого В. 75 років з сечі, діагноз – хронічний цистит і пієлонефрит в стадії загострення. Штам чутливий до цефтриаксону, цефалперазон, цефепиму, гатифлоксацину, левофлоксацину, фосфоміцину, фурамагу, слабочутливий до амоксиклаву, цефалоспоринів 1-2 покоління, ципрофлоксацину, офлоксацину, фуразолідону, нітроксоліну. Середньоадгезивний.

*Pseudomonas aeruginosa* № 43 клінічний штам, виділений від хворої Т. 59 років з раневого вмісту шкіри, діагноз – травма руки з глибоким порізом м'яких тканин. Штам чутливий до цефалперазону, гатифлоксацину, не чутливий до цефалоспоринів і фторхінолонам 1-2 покоління, гентаміцину, фуразолідону, нітроксоліну. Сильноадгезивний. Висока здатність до плівкоутворення.

*Pseudomonas aeruginosa* № 53 клінічний штам, виділений від хворого Н. 73 років з сечі, діагноз – пієлонефрит. Штам чутливий до поліміксину, фосфоміцину, слабочутливий до фторхінолонів і до цефалоспоринів. Сильноадгезивний. Висока здатність до плівкоутворення.

*Enterobacter cloacea* № 64 клінічний штам, виділений від хворого Н. 68 років з сечі, діагноз – хронічний пієлонефрит. Штам чутливий до гентаміцину, амікацину, поліміксину, фосфоміцину, нітроксоліну, гатифлоксацину, слабочутливий до фторхінолонів і до цефалоспоринів. Середньоадгезивний.

*Candida albicans* № 112 клінічний штам, виділений від хворої О. 19 років з вагінального секрету, діагноз – бактеріальний вагініт. Штам чутливий до флуконазолу, орунгалу, слабочутливий до нізоралу, ністатину. Середньоадгезивний.

*Candida albicans* № 19 клінічний штам, виділений від хворого Б. 57 років з ротової порожнини, діагноз – стоматит. Штам чутливий до флуконазолу, ністатину, орунгалу, пімафуцину. Середньоадгезивний.

*Aspergillus niger* № 21 клінічний штам, виділений від хворого К. 69 років з мокротиння, діагноз – хронічна пневмонія. Штам чутливий до інтраконазолу, слабочутливий до флуконазолу, клотримазолу. Середньоадгезивний.

Визначення чутливості штамів мікроорганізмів до досліджуваних зразків екстрактів проводили у відповідності до методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» (Наказ Міністерства охорони здоров'я України від 05.04.2007 р. № 167) методом колодязів на середовищі Мюллера-Хінтона («Himedia Laboratories» Pvt. Ltd India). Середовища для культивування застосовували відповідно до виду мікроорганізмів згідно з існуючими методичними розробками і рекомендаціями, та готували відповідно до інструкції виробника. Чутливість грибів визначали на середовищі «Сабуро-декстрозний агар». Визначення чутливості дослідних речовин проводили на двох шарах поживного середовища, які розливали у чашки Петрі. Нижчий шар складався з агар-агару (10 мл). На нього встановлювали 3-6 металеві стерильні циліндри діаметром 8 мм та висотою 10 мм. Навколо циліндрів заливали верхній шар (14 мл поживного середовища + 1 мл

мікробного розчину 0,5 од. за шкалою McFarland), який складався з поживного агарізованого середовища з відповідним стандартом добової культури мікроорганізму. Приготування суспензій мікроорганізмів із визначеною концентрацією мікробних клітин (оптична щільність) проводили за допомогою стандарту каламутності (0,5 од. за шкалою McFarland). Використовували прилад Densi-La-Meter (виробництва PLIVA-Lachema, Чехія; довжина хвилі 540 нм). Суспензію готували згідно з інструкцією до приладу та інформаційним листом про нововведення в системі охорони здоров'я № 163-2006 “Стандартизація приготування мікробних суспензій”, м. Київ [64]. Синхронізацію культур проводили за допомогою низької температури (4 °C). Після застигання стерильним пінцетом виймали колодязі і в лунки вносили дослідну речовину (0,3 мл).

Визначення протимікробної та антикандидозної дії проводили стандартним методом двократних серійних розведень у поживному бульйоні (макрометод). Тестування проводилось в об'ємі 1мл кожного розведення речовин з кінцевою концентрацією досліджуваного мікроорганізму приблизно  $5 \times 10^5$  КУО/мл. Після інкубації протягом доби або 48–72 годин для культур *Candida spp.* пробірки з посівами переглядали у промінному світлі для визначення росту мікроорганізму.

Мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) встановлювалась за найменшою концентрацією досліджуваної речовини, яка пригнічувала видимий ріст культури. Для визначення мінімальної бактерицидної концентрації (МБЦК) виконували дозовані висіви на тверде поживне середовище (агар Мюллер-Хінтона) культуральної рідини з усіх пробірок, у яких не спостерігали росту мікроорганізму. За МБЦК вважали найнижчу концентрацію, яка викликала загибель не менше 99,9 % бактерій.

При проведенні дослідів додатково здійснювали контроль росту культури в середовищі без досліджуваних речовин, у розчиннику; контроль чистоти суспензії мікроорганізму (шляхом висіву на неселективні середовища) та стерильності середовища [15, 22].

Оцінку антибактеріальної активності дослідних зразків проводили за діаметром зон затримки росту, що є найбільш показовим та об'єктивним показником:

- 10 мм - мікроорганізм не чутливий до дослідної речовини;
- 10-15 мм – мікроорганізм слабочутливий до дослідної речовини;
- 15-25 мм - мікроорганізм чутливий до дослідної речовини;
- 25 мм та вище - мікроорганізм високочутливий до дослідної речовини.

## 2.5 Дослідження морфолого-анатомічної будови сировини безсмертника приквіткового

Об'єктами вивчення були квітки, трава, стебло, листя та корені безсмертника приквіткового. Для вивчення морфологічної та анатомічної будови досліджуваної сировини використовували лупу та бінокулярний мікроскоп «МС 10», при збільшенні  $\times 40$ ,  $\times 100$ ,  $\times 400$  разів. (окуляри  $\times 5$ ,  $\times 10$ ,  $\times 15$ , об'єктиви  $\times 10$ ,  $\times 40$ ). При мікроскопічному дослідженні для вивчення анатомічної будови сировини готували мікропрепарати фіксовані в суміші етанол 96 % – гліцерин – вода очищена (1:1:1). Фотографії робили за допомогою фотоапарату Sony DSC-W80 (діафрагма F / 3.2, витримка 1/80 с.). Вивчення анатомічної будови органів рослини здійснювали за методиками мікроаналізу на поперечних і поздовжніх зрізах та на поверхневих препаратах досліджуваних об'єктів [3, 7, 67, 86].

## 2.6 Дослідження технологічних параметрів сировини безсмертника приквіткового

Для трави та квіток безсмертника приквіткового були визначені та проаналізовані наступні технологічні параметри: втрата в масі при висушуванні, середній розмір часток, насипна густина до та після усадки, об'ємна густина, коефіцієнт поглинання для води і етанолу 70 %, питома маса, пористість сировини, нарізність шару, вільний об'єм шару. Дослідження проводили згідно ДФУ [19, 20].

*Втрата в масі при висушуванні*

Сировину у кількості біля 5,0 г сушили при температурі 120 °С протягом 3 год, потім вимірювали масу сировини та розраховували різницю. Втрату в масі при висушуванні проводили для трави и квіток безсмертника приквіткового. Випробування проводили для 5 серії сировини.

*Визначення середнього розміру часток*

Середній розмір часток (d) подрібненої сировини визначали методом ситового аналізу. Для цього спочатку визначали фракційний склад подрібненої сировини за формулою 2.7, а потім здійснювали розрахунки середнього розміру часток сировини в мм за формулою 2.8:

$$d_i = \frac{d_{\max} + d_{\min}}{2}, \quad (2.7)$$

де  $d_{\max}$  – діаметр сита, крізь який подрібнені частки сировини проходять, мм;

$d_{\min}$  – діаметр сита, на якому подрібнені частки сировини затримуються, мм.

$$d = \frac{a_i \cdot d_i}{100}, \quad (2.8)$$

де  $a_i$  – місткість кожної фракції, %;

$d_i$  – середній розмір часток кожної фракції, мм;

$i$  – кількість фракцій.

Випробування проводили для 5 серії сировини.

*Визначення питомої маси сировини*

Питома маса являє собою відношення маси абсолютно сухої подрібненої сировини до об'єму рослинної тканини. Близько 5,0 г (точна наважка) подрібненої сировини вміщували у пікнометр місткістю 100 мл, заливали водою очищеною на 2/3 об'єму і витримували на киплячій водянній бані близько 1,5-2 год, періодично перемішуючи з метою повного виділення повітря з сировини. Потім пікнометр охолоджували до температури 20 °С і доводили об'єм водою очищеною до мітки.

Таким чином визначали масу пікнометра з сировиною і водою. Розрахунок питомої маси ( $d_y$ ) проводили за формулою:

$$d_y = \frac{P \cdot d_{ж}}{P + G - F}, \quad (2.9)$$

де  $P$  – маса абсолютно сухої подрібненої сировини, г;

$G$  – маса пікнометра з водою очищеною, г;

$F$  – маса пікнометра з водою та сировиною, г;

$d_{ж}$  – питома маса води, г/см<sup>3</sup> ( $d_{ж} = 0,9982$  г/см<sup>3</sup>).

Визначення проводили для 5 серії сировини.

*Визначення насипної густини сировини до і після усадки*

Показник насипного об'єму характеризує здатність рослинного матеріалу займати певний об'єм і змінювати його після усадки. Насипна густина ( $d_n$ ) являє собою відношення маси подрібненої сировини з природною або наведеною вологістю до повного об'єму, що займає сировина разом з порами часток та вільним об'ємом між ними.

У мірний циліндр завантажували подрібнену сировину, злегка струшуючи її до вирівнювання, і визначали повний об'єм, який вона займає. Потім сировину зважували. Розрахунок насипної густини ЛРС ( $d_n$ ) проводили за формулою:

$$d_n = \frac{P_n}{V_n}, \quad (2.10)$$

де  $P_n$  – маса подрібненої сировини при природній або заданій вологості, г;

$V_n$  – об'єм, який займає сировина, см<sup>3</sup>.

Потім закріплювали циліндр на підставці і проводили 2500 зіскоків циліндра і фіксували об'єми  $V_{2500}$  з точністю до найближчої позначки. Розрахунок насипної густини після усадки ( $d_{nv}$ ) також проводили за формулою:



$$d_{nv} = \frac{P_n}{V_{2500}}, \quad (2.11)$$

де  $P_n$  – маса подрібненої сировини при природній або заданій вологості, г;

$V_{2500}$  – об'єм, який займає сировина після усадки,  $\text{см}^3$ .

Дослідження проводили для 5 серії сировини.

#### *Визначення об'ємної густини сировини*

Об'ємна густина ( $d_o$ ) це відношення маси неподрібненої сировини з природною або наведеною вологістю до її повного об'єму, що вміщує пори, щілини та капіляри, заповнені повітрям. Близько 10 г (точна наважка) неподрібненої сировини швидко занурювали в мірний циліндр з водою очищеною і визначали об'єм. За різницею об'ємів у мірному циліндрі визначали об'єм, який займає сировина. Розрахунок об'ємної густини ЛРС ( $d_o$ ) проводили за формулою:

$$d_o = \frac{P_o}{V_o}, \quad (2.12)$$

де  $P_o$  – маса неподрібненої сировини з природною або наведеною вологістю, г;

$V_o$  – об'єм, який займає сировина,  $\text{см}^3$ .

Дослідження проводили для 5 серії сировини.

#### *Визначення коефіцієнту водопоглинання*

Показник водопоглинання необхідний для розрахунку об'єму екстрагенту, який використовується для виготовлення екстракту. Цей показник залежить від багатьох факторів: ступеня подрібнення сировини, пористості, вмісту води, виду ЛРС та екстрагенту, вмісту екстрактивних речовин тощо. Враховуючи вплив багатьох факторів, користуватись середніми табличними значеннями Квп не завжди раціонально.

Для визначення коефіцієнту водопоглинання для води наважку сировини масою 10,0 г заливали водою очищеною 100 мл і готували водну витяжку за загальними

правилами виготовлення настою. Після нагрівання впродовж 15 хв та охолодження протягом 45 хв настій проціджували, залишок віджимали в перфорованому стакані інфундирки і виміряли об'єм витяжки. Коефіцієнт водопоглинання ( $K_B$ ) розраховували за формулою:

$$K_B = \frac{V_1 - V_2}{a}, \quad (2.13)$$

де  $V_1$  – об'єм води для виготовлення настою, (100 мл);

$V_2$  – об'єм водної витяжки, отриманий в експерименті після віджимання сировини, мл;

$a$  – наважка лікарської рослинної сировини, г.

Дослідження проводили для 5 серії сировини.

*Визначення коефіцієнту поглинання для етанолу 70 %*

Для цього наважку сировини поміщали у градуйований скляний циліндр з притертою пробкою. До випробуваного зразка додавали етанол концентрації 70 % і закривали циліндр пробкою. Залишали для настоювання протягом 8 годин. Через 8 годин після початку випробування зливали екстрагент вимірювали об'єм злитого екстракту. Коефіцієнт поглинання для 70% етанолу  $K_{сп70\%}$  визначали за формулою:

$$K_{сп70\%} = \frac{V_1 - V_2}{a}, \quad (2.14)$$

де  $V_1$  – об'єм 70 % етанолу для виготовлення настойки, (100 мл);

$V_2$  – об'єм витяжки, отриманий в експерименті після віджимання сировини, мл;

$a$  – наважка лікарської рослинної сировини, г.

Дослідження проводили для 5 серії сировини.

*Визначення пористості сировини*

Цей показник сировини вказує на величину внутрішнього вільного простору часток сировини і визначається, як відношення різниці між питомою та об'ємною масою до питомої маси. Пористість ( $\rho_b$ ) розраховували за формулою:

$$\rho_b = \frac{d_y - d_o}{d_y}, \quad (2.15)$$

де  $d_y$  – питома маса сировини, г/см<sup>3</sup>;

$d_o$  – об'ємна густина сировини, г/см<sup>3</sup>.

#### *Визначення нарізності шару*

Цей показник характеризує величину вільного простору між частинками рослинного матеріалу і визначається, як відношення різниці між об'ємною та насипною густиною до об'ємної густини. Нарізність ( $\Pi_c$ ) розраховували за формулою:

$$\Pi_c = \frac{d_o - d_n}{d_o}, \quad (2.16)$$

де  $d_o$  – об'ємна густина сировини, г/см<sup>3</sup>;

$d_n$  – насипна густина сировини, г/см<sup>3</sup>.

#### *Визначення вільного об'єму шару*

Визначає відносний об'єм вільного простору в одиниці сировинного матеріалу (внутрішній вільний простір часток та між частками) і визначається, як відношення різниці між питомою масою і насипною густиною до питомої маси. Вільний об'єм шару ( $V$ ) розраховували за формулою:

$$V = \frac{d_y - d_n}{d_y}, \quad (2.17)$$

де  $d_y$  – питома маса сировини, г/см<sup>3</sup>;

$d_n$  – насипна густина сировини, г/см<sup>3</sup>.

*Визначення загальної золи сировини безсмертника приквіткового*

Дослідження проводили на п'яти серіях кожного виду сировини. Вміст загальної золи (X) у відсотках у перерахунку на абсолютно суху сировину обчислювали за формулою:

$$X = \frac{m_1 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot (100 - W)}, \quad (2.18)$$

де  $m$  – маса золи, г;

$m_1$  – маса наважки сировини, г;

$W$  – втрата в масі при висушуванні, %.

*Визначення екстрактивних речовин сировини безсмертника приквіткового*

Визначення вмісту екстрактивних речовин в 5 серіях сировини за методикою ДФ СРСР XI видання [19]. При цьому розрахунок вмісту екстрактивних речовин у відсотках (X) у перерахунку на абсолютно суху сировину обчислювали за формулою:

$$X = \frac{m \cdot V \cdot 100 \cdot 100}{m_1 \cdot (100 - W)}, \quad 2.19$$

де  $m$  – маса сухого залишку, г;

$m_1$  – маса сировини, г;

$V$  – об'єм екстрагенту, мл;

$W$  – втрата в масі при висушуванні сировини, %.

### РОЗДІЛ 3

## ДОСЛІДЖЕННЯ ЯКІСНОГО СКЛАДУ І ВМІСТУ БІОЛОГІЧНО АКТИВНИХ РЕЧОВИН СИРОВИНИ БЕЗСМЕРТНИКА ПРИКВІТКОВОГО

Згідно даних джерел літератури рослини роду Цмин родини айстрові мають досить різноманітний склад БАР.

Лікарські препарати на основі цмину піскового підсилюють жовчовиділення, підвищують тонус жовчного міхура, зменшують вміст білірубину і концентрацію жовчних кислот.

Рослини роду Цмин застосовують у народній медицині в як засоби, які мають сечогінний, жовчогінний, антигельмінтний та кровоспинний ефекти.

Тому було проведено дослідження якісного складу і визначення вмісту основних класів БАР у досліджуваній сировині безсмертника приквіткового, а саме – фенольних сполук (флавоноїдів, фенолкарбонових кислот), органічних кислот, вуглеводів, летких сполук, амінокислот, жирних кислот, а також макро- та мікроелементів [99, 101].

### 3.1 Вивчення складу фенольних сполук

Для визначення фенольних сполук використовували методи: ПХ, ТШХ, препаративної хроматографії та УФ-спектроскопічний аналіз.

Для ідентифікації фенольних сполук в УФ – світлі використовували розчин аміаку. Речовини ідентифікували за хроматографічними характеристиками (показниками R<sub>f</sub>, флуоресценцією, забарвленням плям до і після обробки реактивами), у порівнянні з достовірними зразками

На підставі хроматографічного та УФ-спектроскопічного аналізу в порівнянні з вірогідними зразками вдалося ідентифікувати ряд фенольних сполук, спектральна та хроматографічна характеристика яких наведена в таблиці 3.1.

**Хроматографічна характеристика та УФ-спектроскопічна характеристика  
фенольних сполук безсмертника приквіткового трави**

№	Речовина	Хімічна структура	Ідентифікація в УФ		Показник Rf × 100 *					УФ спектр **
			Флюоресценція	Флюоресценція з р-ном аміаку	1	2	3	4	5	λ max, нм
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Лютеолін	5, 7, 3', 4'- тетрагідроксифлавіон	перламутрове	жовте	6	46	89	86	60	242пл, 353, 267, 291пл, 348
2	Ізо- орієнтин	6-С-β-D- глюкопіранозиллютеолін	перламутрове	жовте	35	63	46	58	76	255, 269, 348
3	Цинарозид	лютеолін-7-О-β-D- глюкозид	перламутрове	жовте	20	60	53	62	78	255, 267пл, 348
4	Апігенін	4', 5,7- тригідроксифлавіон	коричневе	зелене	12	66	90	82	62	270, 280пл, 335

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	Кверцетин	3,3',4',5,7- пентагідроксифлаво́н	жовте	жовте	10	41	78	80	68	255, 270, 375
6	Кемпферол	3,4', 5,7- тетрагідроксифлаво́н	жовте	жовте	7	50	75	78	65	265, 370
7	Брактєїн	6, 3', 4' 5' - тетрагідрокси – 4 – O – β – D – глюкопіранозилаурон	жовте	помаранчеве- червоне	9	41	38	26	43	260, 325пл, 406
8	Цернуозид	6, 3', 4' - тетрагідрокси – 4 – O – β – D – глюкопіранозилаурон	світло-жовте	помаранчеве- червоне	14	54	45	46	59	262, 338, 404
9	Ауреузидин	4, 6, 3', 4' - тетрагідроксиаурон	жовте	помаранчеве- червоне	2	32	63	53	35	260, 332, 399

## Примітки:

1.\* рухома фаза для хроматографії: 1) 15 % оцтова к-та; 2) 30 % оцтова к-та; 3) БОВ 4:1:5; 4) БОВ 3:1:1; 5) Оцтова к-та–хлористоводнева к-та–вода 30:3:10.

2.\*\* у метанольному розчині. Визначали методом препаративної хроматографії.

У результаті проведення хроматографічних досліджень і УФ-спектроскопії в траві безсмертника приквіткового вперше були виявлені ряд фенольних сполук, серед яких ідентифіковано такі: флаволи – лютеолін, ізо-орієнтин, цинарозид, апігенін, флавоноли – кверцетин, кемпферол, аурони – брактеїн, цернуозид, ауреузидин [65, 100].

### 3.2 Визначення складу та вмісту флавоноїдів

Для аналізу безсмертника приквіткового трави і квіток використовували метод рідинної хроматографії, який був проведено на хроматографі Agilent Technologies 1200. Розділення проводили на хроматографічній колонці Zorbax SB-C18 (3,5 мкм, 150 x 4,6 мм) (Agilent Technologies, USA). Хроматограми вивчення складу флавоноїдів наведено на рис. 3.1 і 3.2, аналіз вмісту флавоноїдів – у таблиці 3.2.

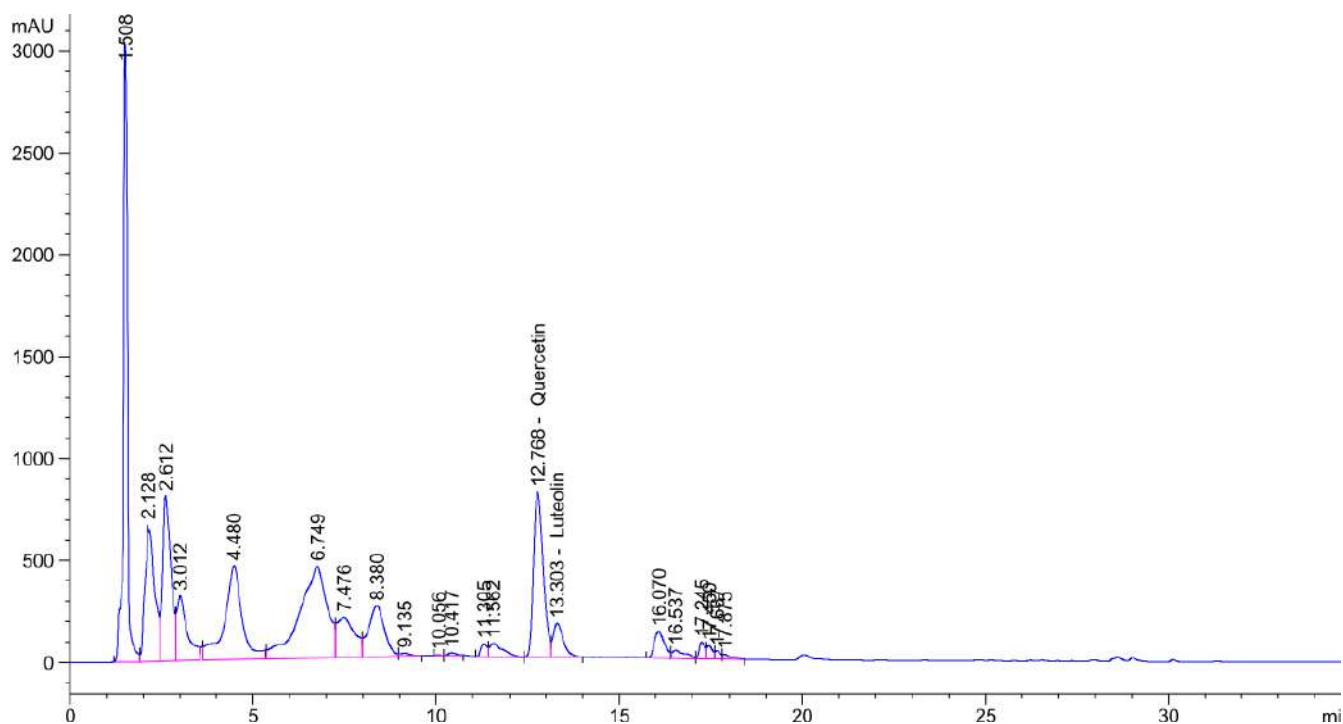


Рис. 3.1 ВЕРХ-хроматограма, отримана в умовах визначення флавоноїдів у безсмертника приквіткового квітках



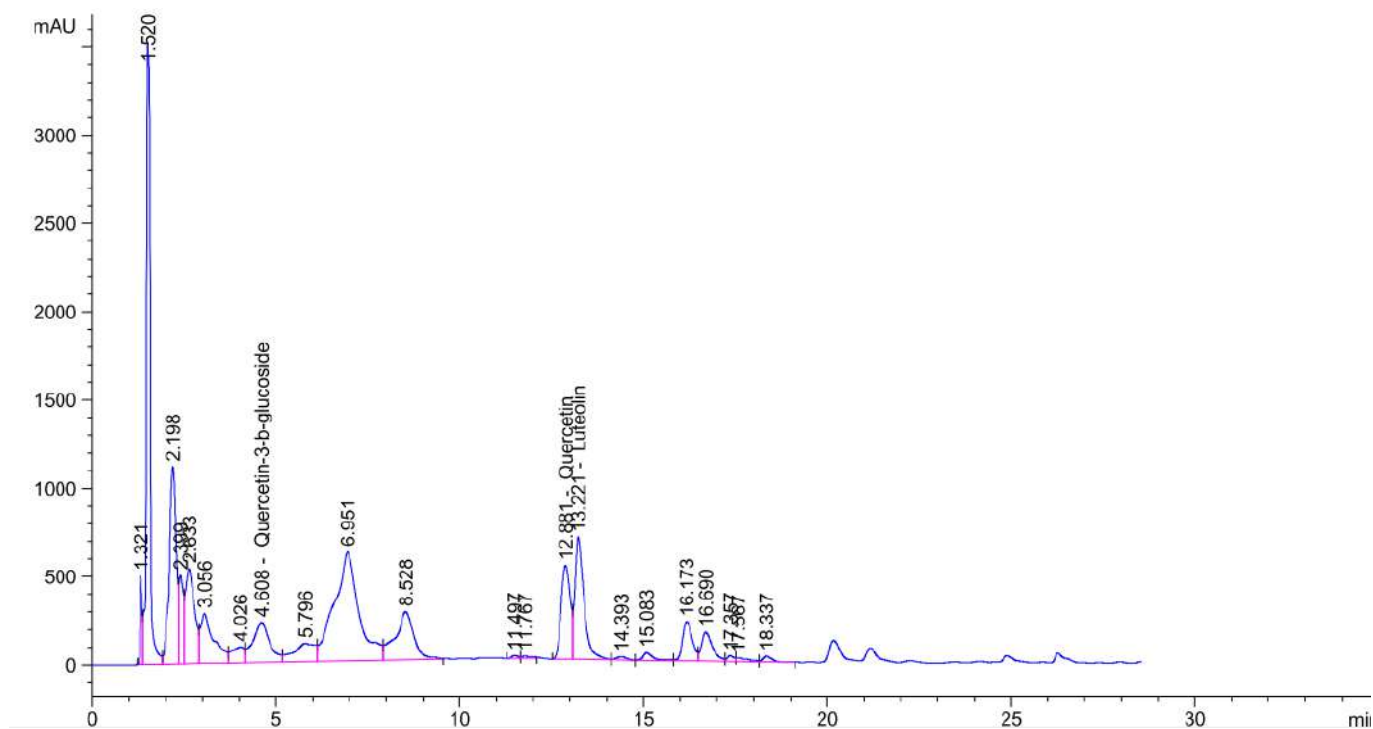


Рис. 3.2 ВЕРХ-хроматограма, отримана в умовах визначення флавоноїдів у безсмертника приквіткового трави

Таблиця 3.2

### Вміст флавоноїдів в сировині безсмертника приквіткового

Назва	Час утримування, хв.		Площа піку, mV×сек.		Вміст (мкг/г)	
	Квітки	Трава	Квітки	Трава	Квітки	Трава
Кверцетин-3-О-β-D-глюкозид	–	4,608	–	7227,029	–	494,16
Кверцетин	12,768	12,881	14928,404	9054,004	14358,87	7523,81
Лютеолін	13,303	13,221	3117,469	11976,944	2091,03	6882,89
Разом					16449,90	14900,86

Вперше було проведено дослідження вмісту флавоноїдів у траві і квітках. В результаті проведеного аналізу методом ВЕРХ у квітках було ідентифіковано та визначено кількісний вміст флавоноїдів: кверцетину та лютеоліну. У траві було ідентифіковано та визначено вміст флавоноїдів: кверцетин-3-О- $\beta$ -D-глюкозиду, кверцетину і лютеоліну. Результати показали, що в квітках вміст кверцетину складає 14358,87 мкг/г, лютеоліну – 2091,03 мкг/г. У траві вміст кверцетину складає 7523,81 мкг/г, лютеоліну – 6882,89 мкг/г, кверцетин-3-О- $\beta$ -D-глюкозиду – 494,16 мкг/г [47].

### 3.3 Дослідження вмісту суми флавоноїдів

Для визначення суми флавоноїдів використовувався УФ-спектроскопічний метод аналізу. УФ-спектри представлені на рисунках 3.3 і 3.4. Розрахунок суми флавоноїдів приведено у таблиці 3.3. Статистична обробка результатів наведена у таблиці 3.4.

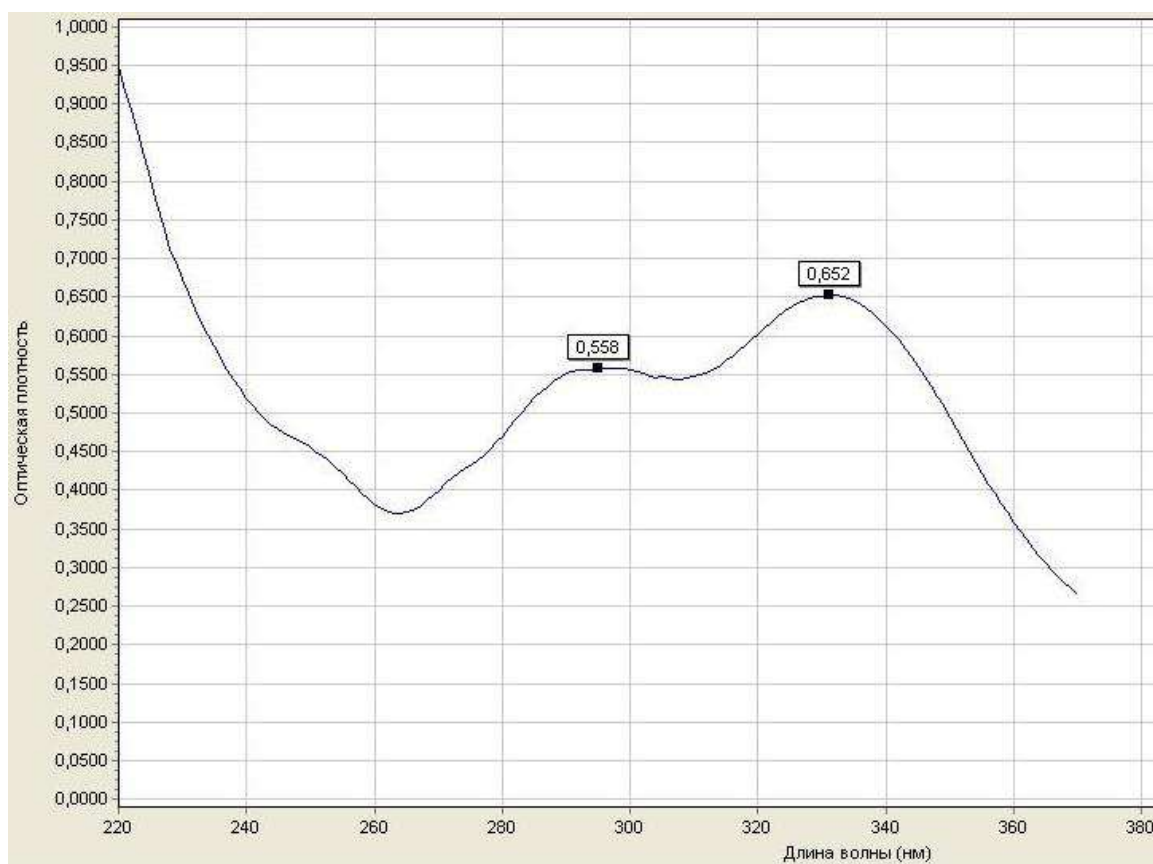


Рис. 3.3 УФ-спектр спиртового екстракту з безсмертника приквіткового квіток

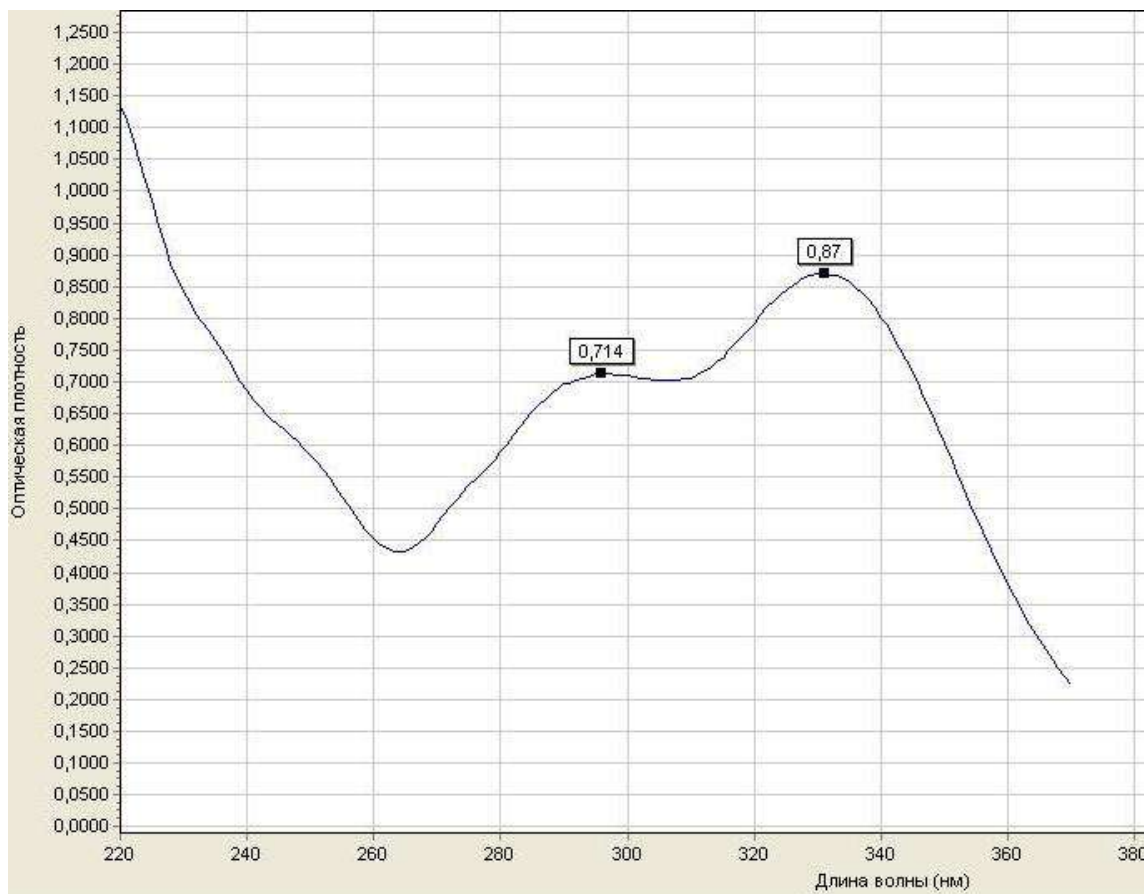


Рис. 3.4 УФ-спектр спиртового екстракту з безсмертника приквіткового трави

Таблиця 3.3

**Вміст суми флавоноїдів в сировині безсмертника приквіткового ( $m=5$ ), %, у перерахунку на цинарозид і суху сировину**

№	Вміст флавоноїдів в сировині безсмертника приквіткового, %	
	Трава, $X_i$	Квітки, $X_i$
1	2,1757±0,02	1,6101±0,03
2	2,1762±0,05	1,6035±0,04
3	2,1812±0,03	1,6121±0,04
4	2,1811±0,01	1,6122±0,02
5	2,1747±0,02	1,6137±0,03

Таблиця 3.4

**Статистична обробка результатів визначення суми флавоноїдів сировини  
безсмертника приквіткового**

m	f	$X_i$	$X_{\text{сер}}$	$S^2$	S	P	t(P, f)	Сума флавоноїдів, %	$\varepsilon$ , %
Трава безсмертника приквіткового									
5	4	2,1757	2,1778	9,757E-06	0,00312362	0,95	2,78	2,18±0,02	0,40
		2,1762							
		2,1812							
		2,1811							
		2,1747							
Квітки безсмертника приквіткового									
5	4	1,6101	1,6103	1,6172E-05	0,00402144	0,95	2,78	1,61±0,01	0,70
		1,6035							
		1,6121							
		1,6122							
		1,6137							

Вперше проведено визначення суми флавоноїдів у сировині безсмертника приквіткового. Було визначено що вміст суми флавоноїдів у траві складає 2,18±0,02 %, у квітках – 1,61±0,01 % у перерахунку на цинарозид і суху сировину.

### 3.4 Встановлення складу та вмісту фенолкарбонових кислот

Для ідентифікації та аналізу вмісту фенолкарбонових кислот у сировині безсмертника приквіткового застосовували методи ПХ, ТШХ, а також проводили ВЕРХ на хроматографі Agilent Technologies 1200, на хроматографічній колонці Zorbax SB-Aq (4,6 мм±150 мм, 3,5 мкм).

Результати дослідження методом ПХ і ТШХ представлено у таблиці 3.5.

Таблиця 3.5

**Хроматографічна характеристика фенолкарбонових кислот трави  
безсмертника приквіткового**

Фенольні сполуки	Флюоресценція в УФ-світлі		Значення $R_f \times 100$	
	в УФ –світлі	+ $\text{NH}_3$	2% оцтова кислота	БУВ (4:1:2)
Галова кислота	зелена	жовта	43	50
Гідроксифенілоцтова к-та	блакитна	яскраво-блакитна	28	78
Кофейна кислота	блакитна	блакитна	30	80
Кумарова кислота	блакитна	синя	38	90
Ферулова кислота	фіолетова	яскраво-фіолетова	30	87
Синапова кислота	фіолетова	блакитно-фіолетова	51	92
Корична кислота	блакитна	блакитна	31	82
Хінна кислота	блакитна	блакитна	45	65

У результаті аналізу в досліджувальній сировині визначено 8 фенолкарбонових кислот: галову, гідроксифенілоцтову, кофейну, кумарову, ферулову, синапову, коричну та хінну кислоти. Хроматограми отримані у результаті дослідження фенолкарбонових кислот у сировині безсмертника приквіткового методом ВЕРХ представлено на рисунках 3.5 та 3.6, результати дослідження – в таблицях 3.6 і 3.7.

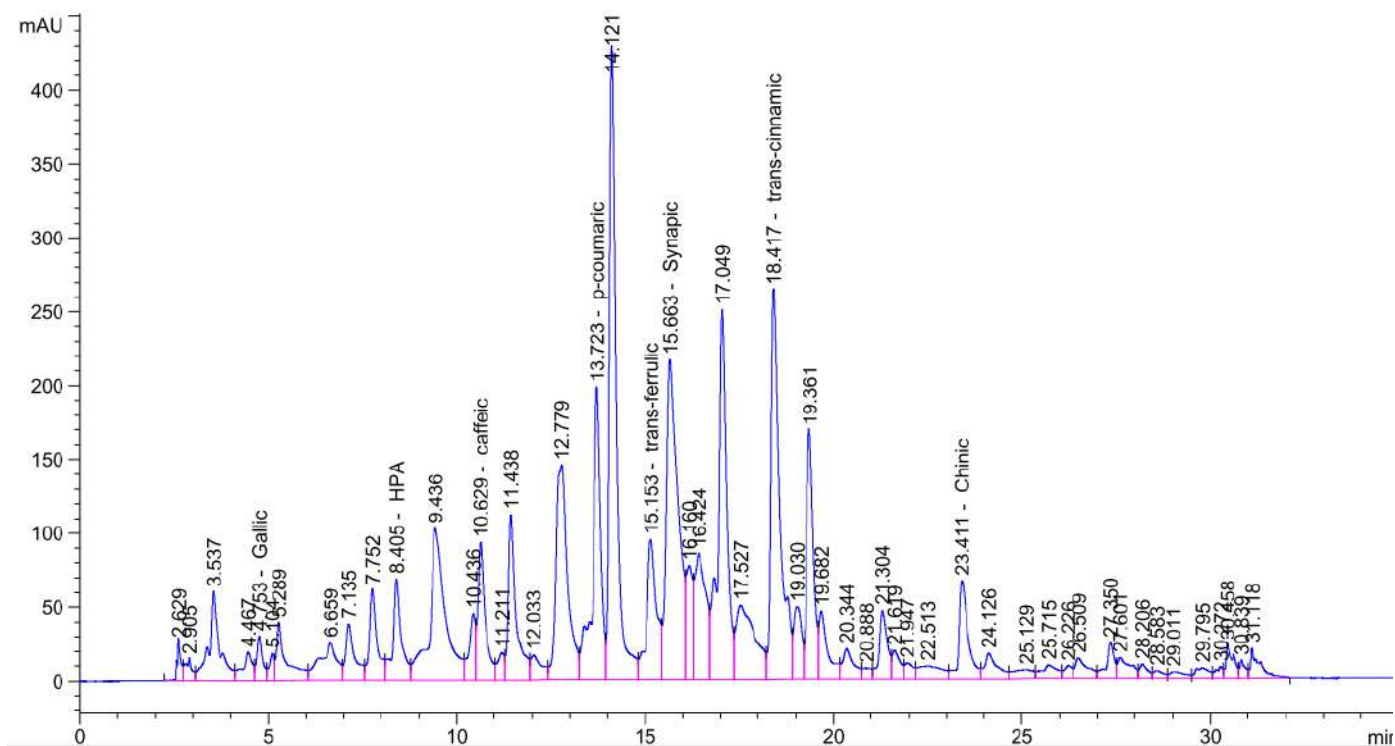


Рис. 3.5 ВЕРХ-хроматограма, отримана в умовах визначення фенолкарбонових кислот у безсмертника приквіткового траві

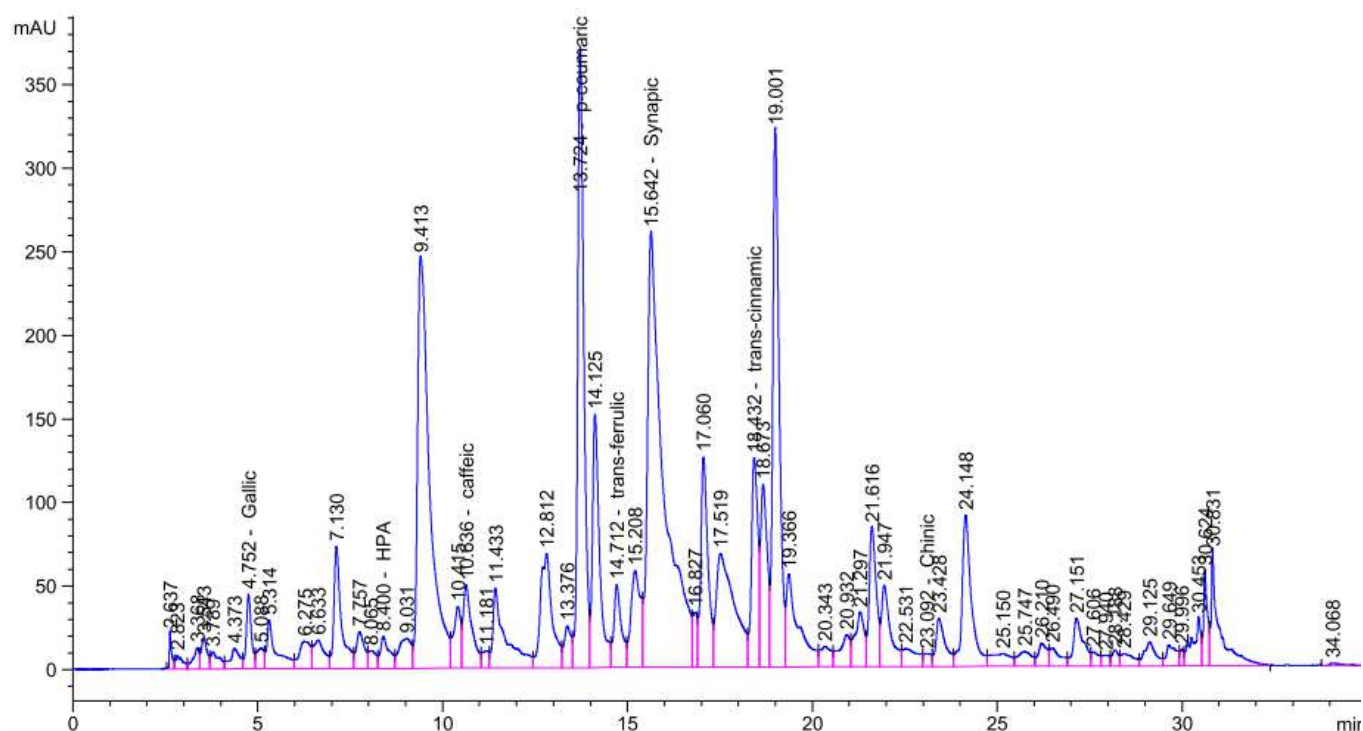


Рис. 3.6 ВЕРХ-хроматограма, отримана в умовах визначення фенолкарбонових кислот у безсмертника приквіткового квітках

Таблиця 3.6

**Вміст фенолкарбонових кислот у сировині безсмертника приквіткового**

Назва	Час утримування, хв.		Площа піку, mV×сек.		Вміст (мкг/г)	
	Трава	Квітки	Трава	Квітки	Трава	Квітки
Галова кислота	4,753	4,752	323,897	423,210	192,41	317,97
Гідроксифенілоцтова к-та	8,405	8,400	1047,003	322,344	695,71	273,21
Кофейна кислота	10,629	10,636	1306,859	841,298	1215,68	996,32
Кумарова кислота	13,723	13,724	3018,904	4292,555	1711,30	3092,03
Ферулова кислота	15,153	14,712	1767,320	716,188	949,67	490,15
Синапова кислота	15,663	15,642	4659,380	8152,927	2025,17	4500,11
Корична кислота	18,417	18,432	4327,013	1515,996	881,68	392,56
Хінна кислота	23,411	23,092	1153,570	111,096	44257,10	4981,55
Разом					51928,71	15043,89

Таблиця 3.7

**Частка вмісту фенолкарбонових кислот у сировині безсмертника приквіткового**

Назва	Частка вмісту, %	
	Трава	Квітки
1	2	3

Продовж. табл. 3.7

1	2	3
Галова кислота	0,37	2,11
Гідроксифенілоцтова кислота	1,34	1,82
Кофейна кислота	2,34	6,62
Кумарова кислота	3,30	20,55
Ферулова кислота	1,83	3,26
Синапова кислота	3,90	29,91
Корична кислота	1,70	2,61
Хінна кислота	85,23	33,11
Разом	100	100

У великій кількості, відносно до загальної суми фенолкарбонових кислот, у квітках безсмертника приквіткового знаходяться хінна (33,11 %), синапова (29,91 %) і кумарова кислоти (20,55 %), у траві превалює хінна кислота (85,23 %). Інші фенолкарбонові кислоти в сировині містяться в значно менших кількостях [46, 50, 101].

### 3.5 Дослідження складу та вмісту органічних кислот

Для ідентифікації та вивчення вмісту органічних кислот у сировині безсмертника приквіткового використовували метод ВЕРХ, який було проведено на хроматографі Agilent Technologies 1200. Розділення здійснювали на хроматографічній колонці Zorbax SB-Aq (4,6 мм±150 мм, 3,5 мкм) (Agilent Technologies, USA). ВЕРХ-хроматограми представлено на рисунках 3.7 та 3.8. Результати визначення представлено у таблиці 3.8, частка у загальній сумі органічних кислот – в таблиці 3.9.



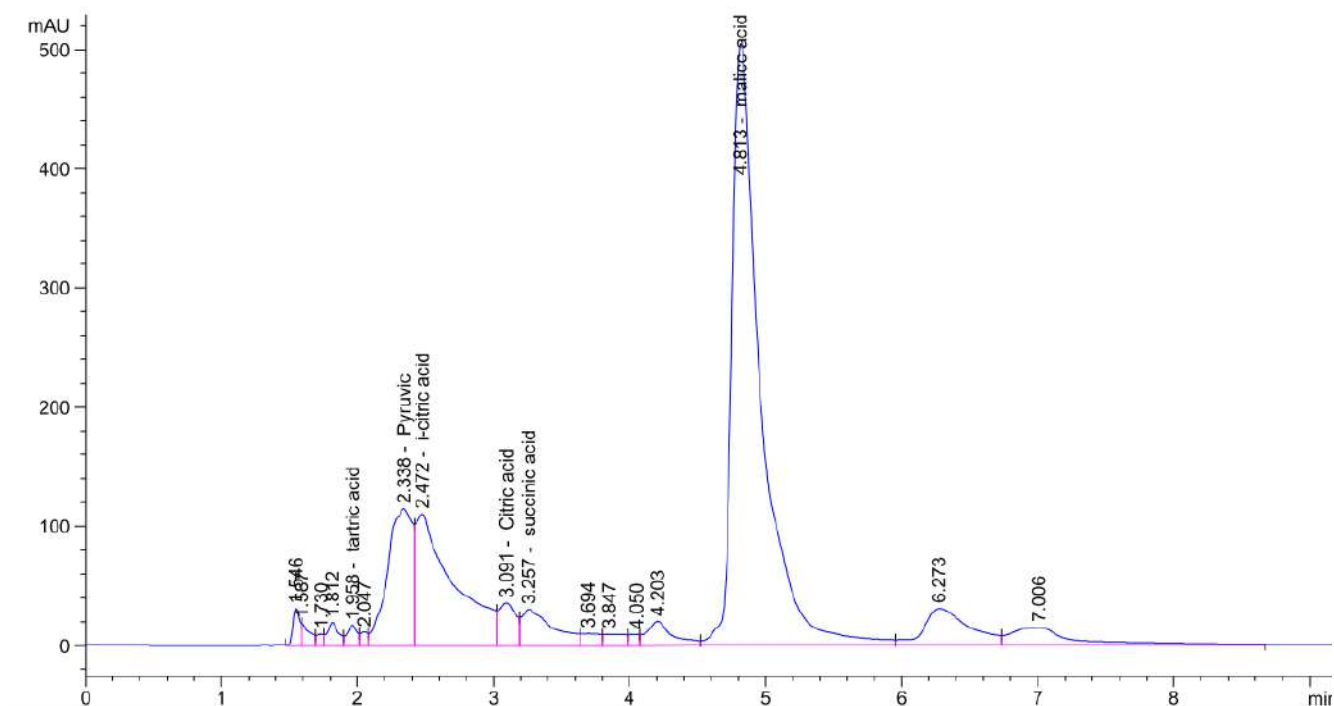


Рис. 3.7 ВЕРХ-хроматограма, отримана в умовах визначення органічних кислот у безсмертника приквіткового траві

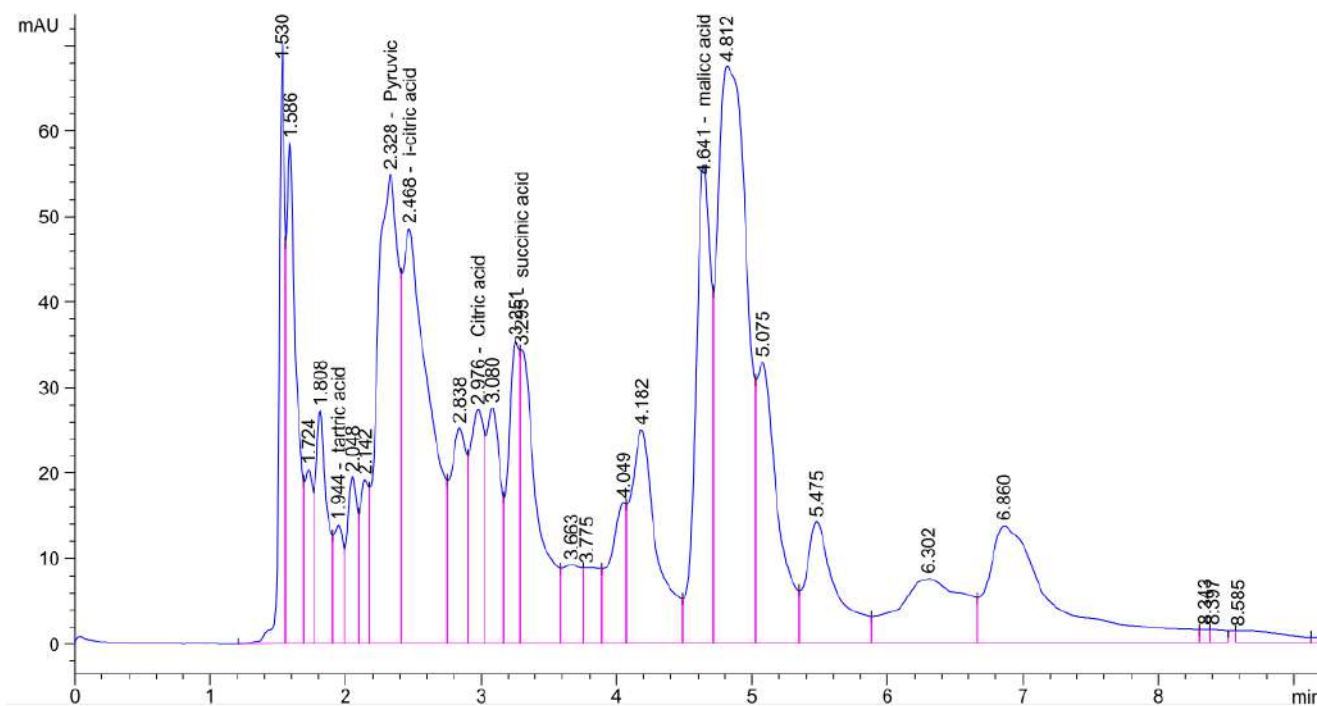


Рис. 3.8 ВЕРХ-хроматограма, отримана в умовах визначення органічних кислот у безсмертника приквіткового квітках

Таблиця 3.8

**Органічні кислоти безсмертника приквіткового квіток і трави**

Назва	Час, утримування, хв		Площа піку, mV×сек		Вміст (мкг/г)	
	Трава	Квітки	Трава	Квітки	Трава	Квітки
Винна кислота	1,958	1,944	88,331	65,100	1079,89	845,29
Піровиноградна кислота	2,338	2,328	1449,333	601,630	4252,95	1886,22
Ізолимонна кислота	2,472	2,468	2137,979	681,082	67613,38	22979,68
Лимонна кислота	3,091	2,976	316,840	197,623	3962,86	2643,01
Бурштинова кислота	3,257	3,295	486,245	311,464	11515,72	7847,18
Яблучна кислота	4,813	4,641	7455,575	437,162	24917,49	1552,53
Разом					113342,29	37753,91

Таблиця 3.9

**Частка вмісту ідентифікованих органічних кислот у загальній сумі**

Назва	Частки в загальній сумі органічних кислот, в %	
	Трава	Квітки
1	2	3
Винна кислота	0,95	2,24

Продовж. табл. 3.9

1	2	3
Піровиноградна кислота	3,75	5,00
Ізолимонна кислота	59,65	60,87
Лимонна кислота	3,50	7,00
Бурштинова кислота	10,16	20,79
Яблучна кислота	21,98	4,11
	100	100

У траві і квітках безсмертника приквіткового ідентифіковано 6 органічних кислот.

При цьому у великій кількості в квітках знаходяться 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).

Решта органічних кислот представлена в значно менших кількостях, на їх частку припадає: у квітках – 4284,04 мкг/г, у траві – 9295,70 мкг/г [44].

### 3.6 Дослідження вуглеводів

Для ідентифікації та визначення вмісту вуглеводів у сировині безсмертника приквіткового використовували метод ГХ/СМ.

Хроматографічне розділення проводили на газовій хромато–мас–спектрометричній системі Agilent 6890N/5973inert (Agilent Technologies, USA). Хроматограми вивчення вуглеводного складу сировини наведено на рис. 3.9-3.12. Результати аналізу вмісту у досліджуваних об'єктах приведено у таблицях 3.10-3.15.

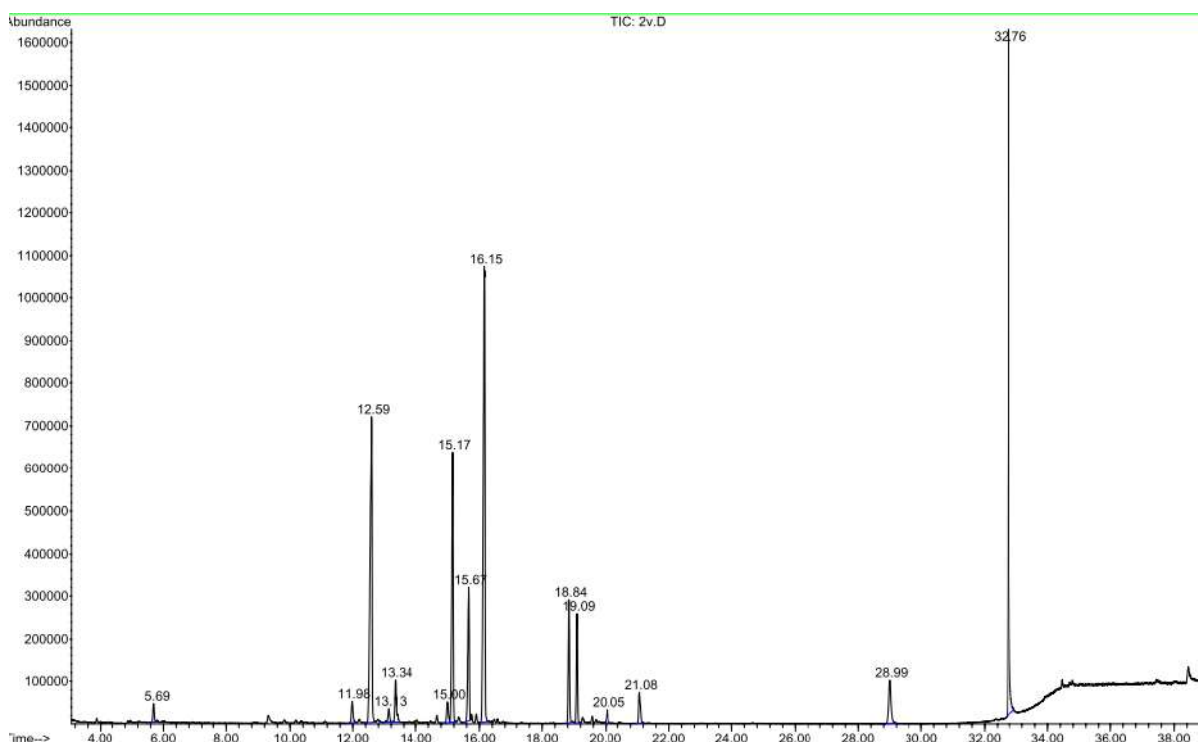


Рис. 3.9 Хроматограма, отримана в умовах визначення вільних вуглеводів у безсмертника приквіткового квітка

Таблиця 3.10

**Вільні вуглеводи у безсмертника приквіткового квітка**

Назва	Час утримування, хв	Вміст моноцукрів (мг/г)
1	2	3
D-арабінонітрил, 2,3,4,5-тетраацетат (арабіноза)	5,69	0,43
Бета-D-рибопіраноза, тетраацетат (рибоза)	11,98	0,61
2,3,4,5,6-пента-о-ацетил-D-глюконітрил (глюкоза)	12,59	10,43
2,3,4,5,6-пента-о-ацетил-D-галактонітрил (галактоза)	13,13	0,39
2,3-Октандіон	13,34	1,19
Ліксопіраноза, тетраацетат (ликсоза)	15,00	0,60

Продовж. табл. 3.10

1	2	3
алло-Інозитол, гексаацетат	15,17	6,79
міо-Інозитол, гексаацетат	15,67	3,33
2,3,4,5,6-пента-о-ацетил- D-фруктонітрил (фруктоза)	18,84	2,73
2,3,4,5,6-пента-о-ацетил- D-фруктонітрил (фруктоза)	19,09	2,20
альфа-D-целобіоза, октаацетат	20,05	0,30
2'-Метилфеніл-тіо-бета-d-галактозид, тетраацетат (складний естер)	21,08	0,93
о-Ацетоксифеніл 2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D- глюкопіранозид	28,00	1,78
Цукрози октаацетат (сахароза)	32,76	12,35

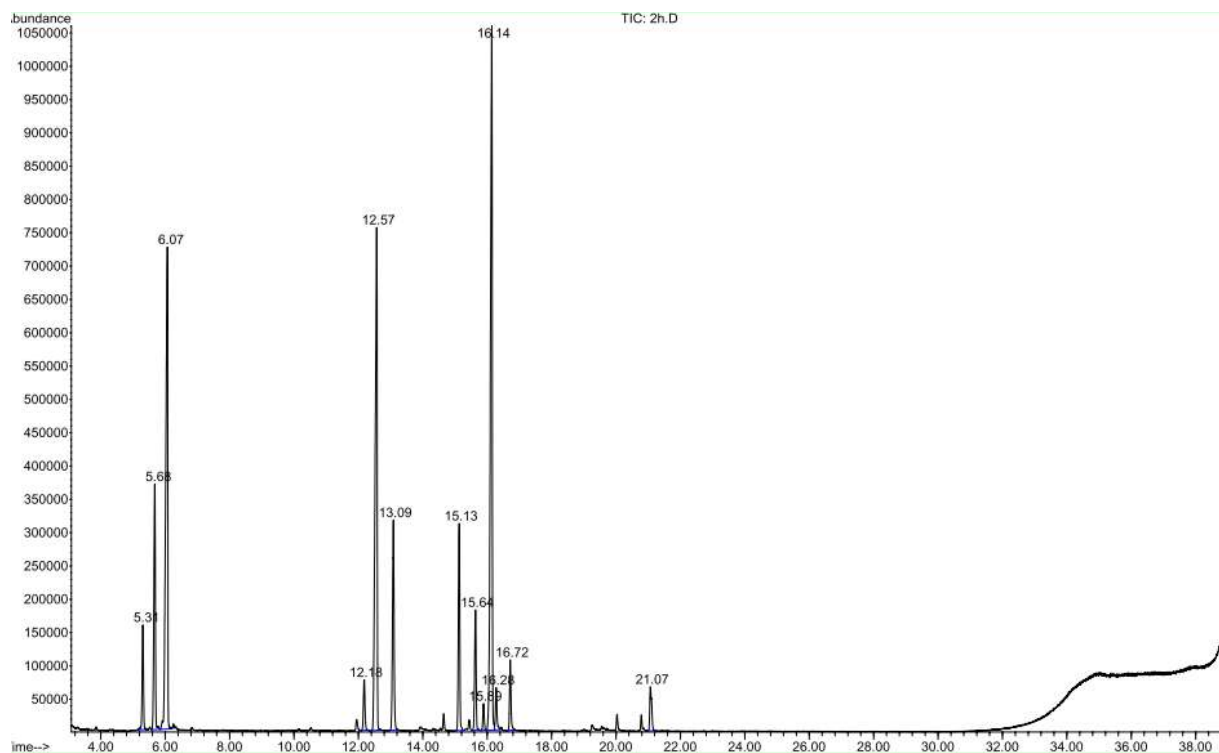


Рис. 3.10 Хроматограма, отримана в умовах визначення зв'язаних вуглеводів у безсмертника приквіткового квітка

Таблиця 3.11

## Зв'язані вуглеводи у безсмертника приквіткового квітках

Назва	Час утримування, хв	Вміст моноцукрів (мг/г)
D-рамнонітрил, 2,3,4,5-тетраацетат (рамноза)	5,30	3,08
D-арабінононітрил, 2,3,4,5-тетраацетат (арабіноза)	5,68	7,93
D-фуконітрил, 2,3,4,5-тетраацетат (фукоза)	6,07	21,38
2,3,4,5,6-пента-о-ацетил-D-манонітрил (маноза)	12,18	1,69
2,3,4,5,6-пента-о-ацетил-D-глюконітрил (глюкоза)	12,57	21,97
2,3,4,5,6-пента-о-ацетил-D-галактонітрил (галактоза)	13,09	7,23
алло-Інозитол, гексаацетат	15,13	6,46
міо-Інозитол, гексаацетат	15,64	3,86
L-Ідітол, гексаацетат	15,89	0,77
D-Дуліцітол, гексаацетат	16,28	1,38
альфа-d-рибопіранозид, 2,3,4-три-О-ацетил-β-d-рибопіранозил, триацетат	16,72	2,11
Салірепін, гексаацетат	21,07	1,85

Таблиця 3.12

## Загальна кількість вуглеводів у безсмертника приквіткового квітках

Назва	Вміст моноцукрів (мг/г)
1	2
D-арабінононітрил, 2,3,4,5-тетраацетат (арабіноза)	8,36

Продовж. табл. 3.12

1	2
бета-D-рибопіраноза, тетраацетат (рибоза)	0,61
2,3,4,5,6-пента-о-ацетил-D-глюконітрил (глюкоза)	32,40
2,3,4,5,6-пента-о-ацетил-D-галактонітрил (галактоза)	7,62
D-рамнонітрил, 2,3,4,5-тетраацетат (рамноза)	3,08
Ліксопіраноза, тетраацетат (ликсоза)	0,60
D-фуконітрил, 2,3,4,5-тетраацетат (фукоза)	21,38
2,3,4,5,6-пента-о-ацетил-D-манонітрил (маноза)	1,69
2,3,4,5,6-пента-о-ацетил- D-фруктонітрил (фруктоза)	2,73
2,3,4,5,6-пента-о-ацетил- D-фруктонітрил (фруктоза)	2,20
цукрози октаацетат (сахароза)	12,35

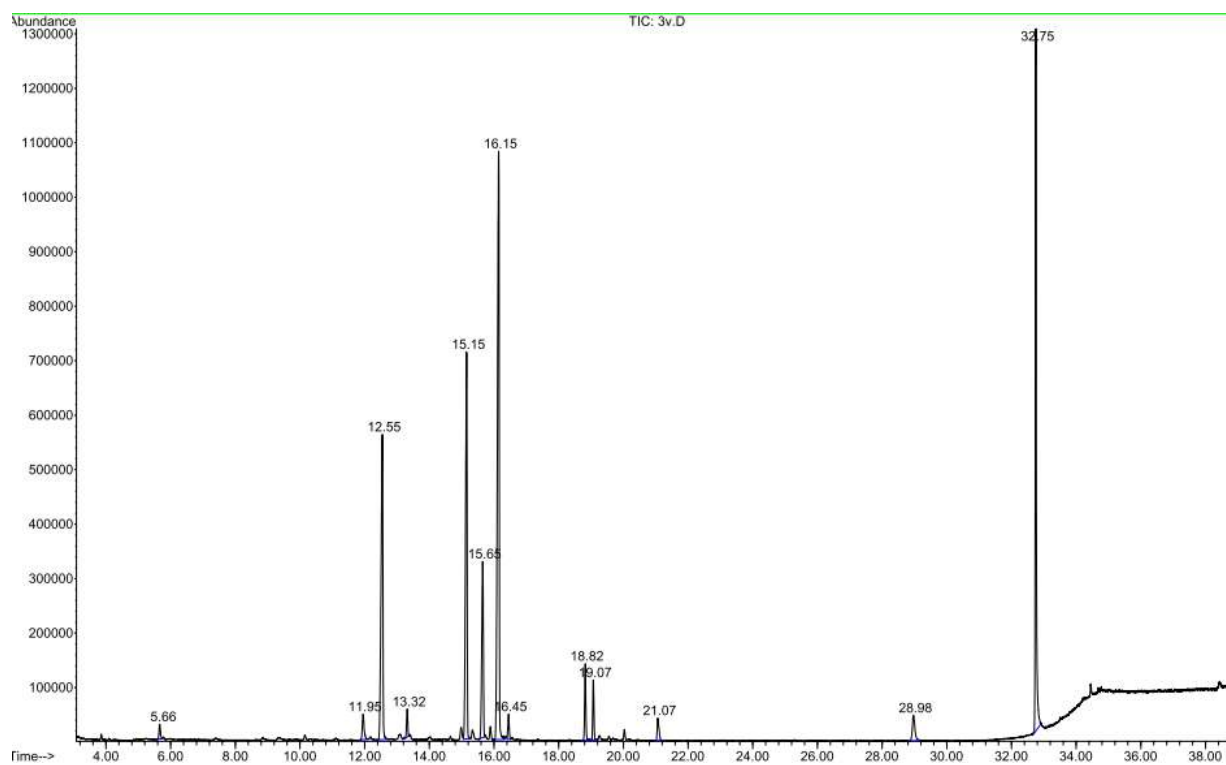


Рис. 3.11 Хроматограма, отримана в умовах визначення вільних вуглеводів у безсмертника приквіткового траві

Таблиця 3.13

## Вільні вуглеводи безсмертника приквіткового трави

Назва	Час утримування, хв	Вміст моноцукрів (мг/г)
D-арабінононітрил, 2,3,4,5-тетраацетат (арабіноза)	5,66	0,27
5H-циклогепта-1,4-діоксин, 2,3,4а, 6,7,9а-гексагідро-, цис-	11,95	0,60
2,3,4,5,6-пента-о-ацетил-D-глюконітрил (глюкоза)	12,55	7,37
Етиліодоацетат	13,32	0,46
алло-інозитол, гексаацетат	15,15	7,89
міо-інозитол, гексаацетат	15,65	3,59
міо-інозитол, гексаацетат	16,45	0,42
Додеканова кислота, естер ізооктилу	18,82	1,26
4-феноксифенетіламін	19,07	0,97
альфа-D-глюкопіранозилбромід, тетраацетат	21,07	0,52
п-хлорфеніл-2,3,4,6-тетра-О-ацетил-β-D-глюкопіранозид	28,96	0,85
цукрози октаацетат (сахароза)	32,75	9,08



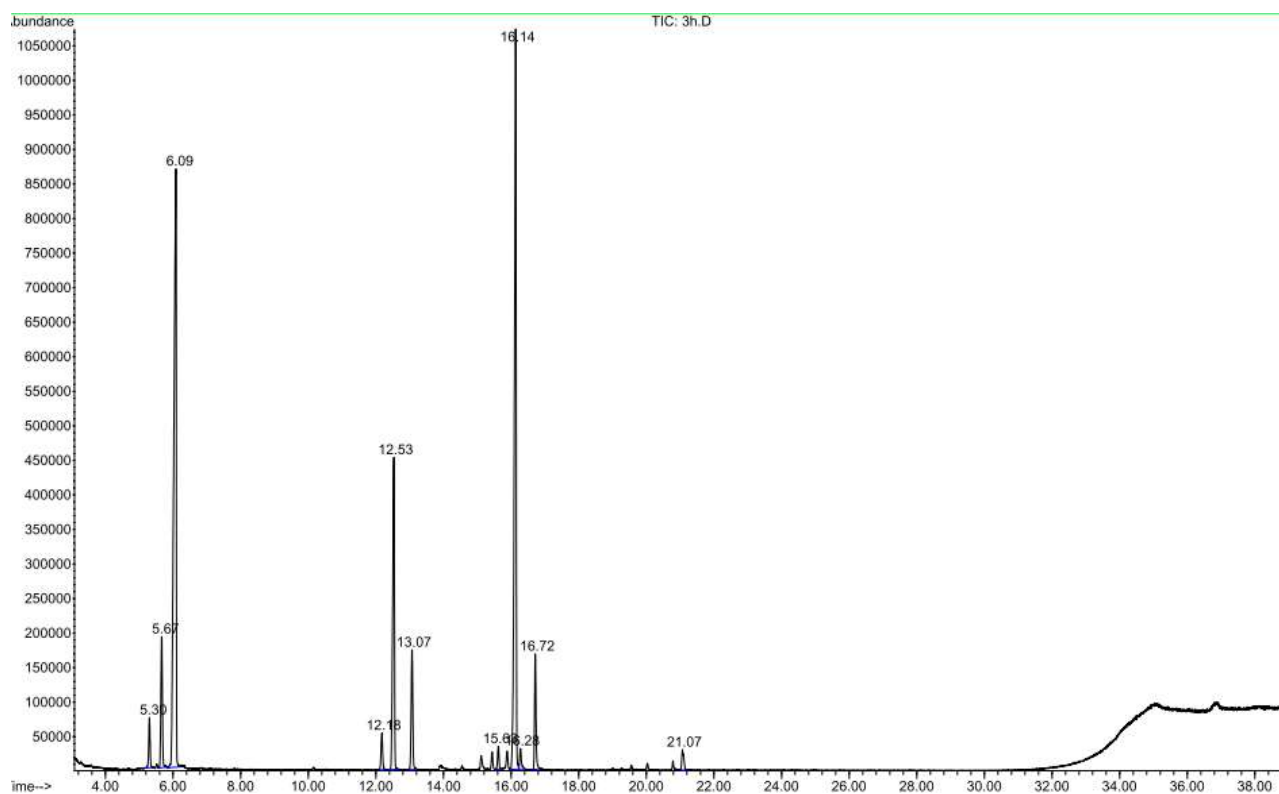


Рис. 3.12 Хроматограма, отримана в умовах визначення зв'язаних вуглеводів у безсмертника приквіткового трави

Таблиця 3.14

**Зв'язані вуглеводи безсмертника приквіткового трави**

Назва	Час утримування	Вміст моноцукрів (мг/г)
1	2	3
D-рамнонітрил, 2,3,4,5-тетраацетат (рамноза)	5,30	1,25
D-арабінононітрил, 2,3,4,5-тетраацетат (арабіноза)	5,67	3,64
D-ксилонітрил, 2,3,4,5-тетраацетат (ксілоза)	6,09	26,84
2,3,4,5,6-пента-о-ацетил-D-манонітрил (маноза)	12,18	1,08
2,3,4,5,6-пента-о-ацетил-D-глюконітрил (глюкоза)	12,53	9,78

Продовж. табл. 3.14

1	2	3
2,3,4,5,6-пента-о-ацетил-D-галактонітрил (галактоза)	13,07	3,49
міо-Інозитол, гексаацетат	15,63	0,60
D-дулцітол, гексаацетат	16,28	0,64
альфа-d-рибопіранозид, 2,3,4-три-О-ацетил-β-d-рибопіранозил, триацетат	16,72	2,99
Салірепін, гексаацетат	21,07	0,75

Таблиця 3.15

### Загальна кількість вуглеводів у безсмертника приквіткового траві

Назва	Вміст моноцукрів (мг/г)
D-рамнонітрил, 2,3,4,5-тетраацетат (рамноза)	1,25
D-арабінононітрил, 2,3,4,5-тетраацетат (арабіноза)	3,91
D-ксилонітрил, 2,3,4,5-тетраацетат (ксилоза)	26,84
2,3,4,5,6-пента-о-ацетил-D-манонітрил (маноза)	1,08
2,3,4,5,6-пента-о-ацетил-D-глюконітрил (глюкоза)	17,15
2,3,4,5,6-пента-о-ацетил-D-галактонітрил (галактоза)	3,49
цукрози октаацетат (сахароза)	9,08

У результаті проведеного дослідження вперше було виявлено в квітках безсмертника приквіткового 12 зв'язаних та 13 вільних вуглеводів. У траві безсмертника приквіткового були виявлені 10 зв'язаних та 12 вільних вуглеводів.

Серед визначених моноцукрів у 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 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 значно в меншій кількості [42].

### 3.7 Встановлення складу летких сполук

Аналіз летких сполук у сировині безсмертника приквіткового проводили ГХ/МС, Хроматографічне розділення проводили на газовій хромато–мас–спектрометричній системі Agilent 6890N/5973 inert. Колонка капілярна HP-5MS, довжина 30 м внутрішній діаметр 0,25 мм товщина нерухомої фази 0,25 мкм. Хроматограми вивчення летких сполук сировини наведено на рис. 3.13 і 3.14. Результати визначення частки вмісту в загальній кількості летких сполук у досліджуваних об'єктах приведено у таблицях 3.16 і 3.17.

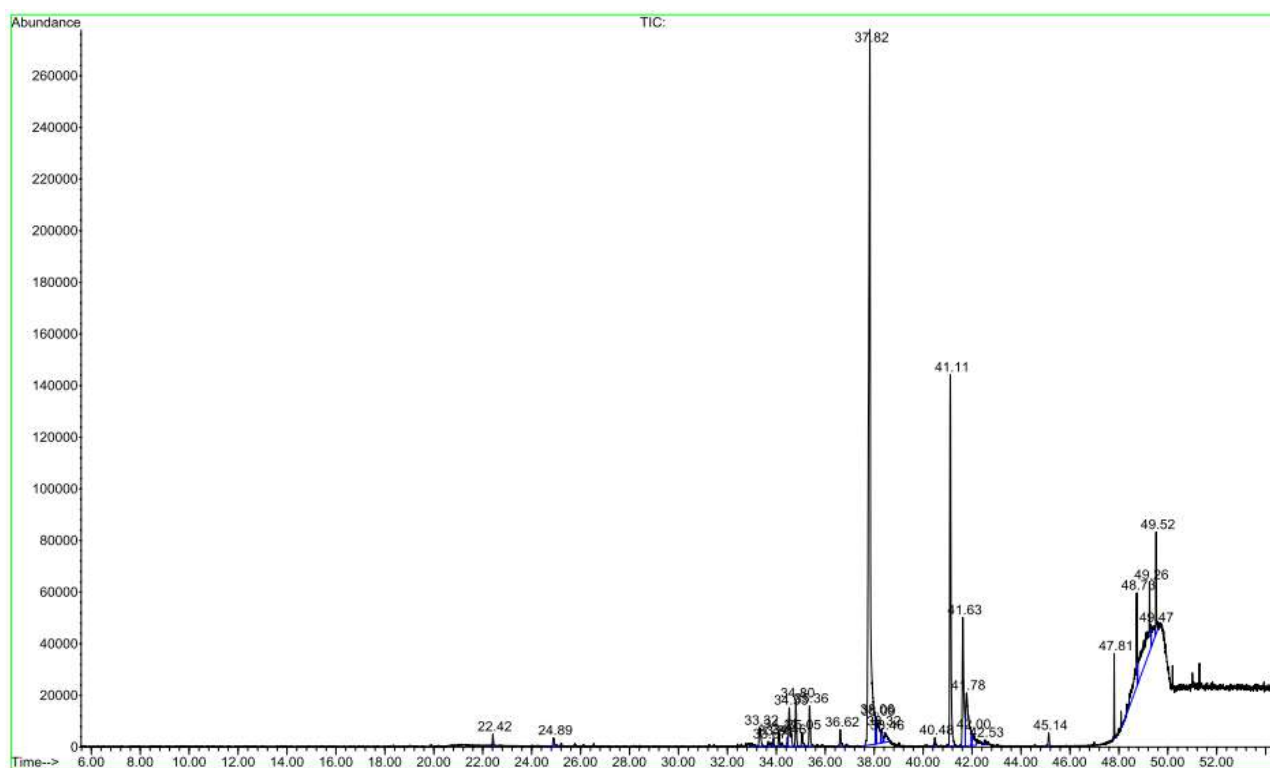


Рис. 3.13 Хроматограма, отримана в умовах визначення летких сполук у безсмертника приквіткового траві

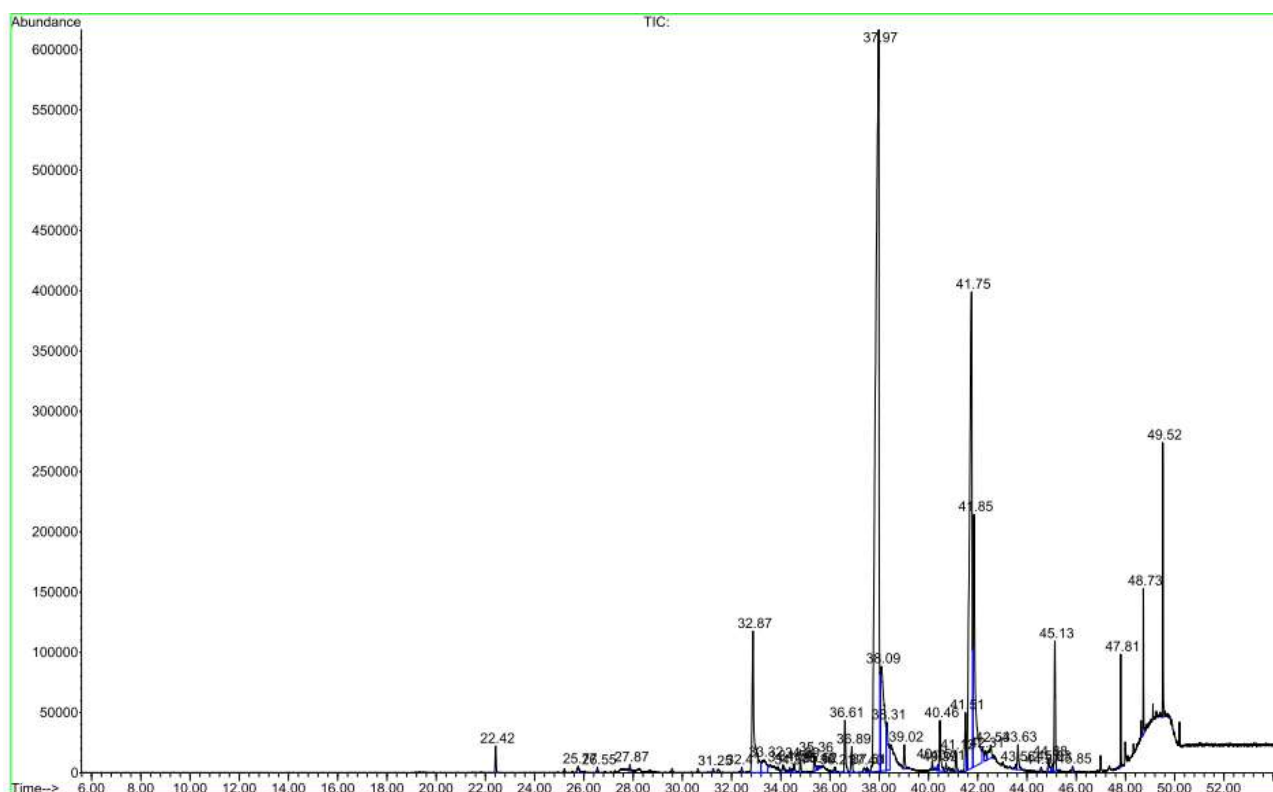


Рис. 3.14 Хроматограма, отримана в умовах визначення летких сполук у безсмертника приквіткового квітках

Таблиця 3.16

**Леткі сполуки безсмертника приквіткового трави**

Назва речовини	Час утримування, хв	Частка вмісту в загальній кількості летких сполук, %
1	2	3
1Н-Циклопропеазулен, 1а,2,3,4,4а,5,6,7b-октагідро-1,1,4,7-тетраметил-, [1аR-(1а.α.,4а.,4а.β.,7b.α)]	22,4173	0,33
2-Метил-5-нітро-2Н-індазол	24,8941	0,41
5-(бензоїлокси)-Пентанал	33,32	1,18

Продовж. табл. 3.16

1	2	3
Циклопентан, бутил	33,6647	0,19
2-метилпропіловий естер бензойної кислоти	33,8818	0,27
Бутиловий естер бензойної кислоти,	34,1116	0,58
N, N-диметил-2-піразинамін	34,4563	0,24
Гептиловий естер бензойної кислоти	34,5329	2,09
2-Пентадеканон, 6,10,14-триметил-	34,7946	1,61
2-Амінобензиловий спирт	35,0563	0,61
Біс (2-метилпропил)вий естер 1,2- Бензендикарбоксилової кислоти,	35,3627	1,60
(-) -цис-Міртаніла ацетат	36,6138	0,67
н-Гексадеканова кислота	37,8203	41,29
Тетрадеканова кислота	38,0564	0,61
н-Гексадеканова кислота	38,0947	2,39
Естра-1,3,5(10) -трієн-17.β.-ол	38,3182	0,59
н-Гексадеканова кислота	38,4586	0,80
2-аміно-Циклопентанеметанамін, 2-аміно-	40,4821	0,38
Фітол	41,1140	13,71
9,12-Октадеканова кислота	41,6311	6,06
9,12-Октадеканова кислота	41,7779	5,16
1-Метил-2-метилециклогексан	41,995	1,01
1,6;3,4-Діангідро-2-деокси-. β-d-ліксо- гексопіраноза	42,5248	0,21
Октакозан	45,1355	0,43
Ейкозан	47,8101	1,11

Продовж. табл. 3.16

1	2	3
Бенз[b]-1,4-оксазепін-4(5H) -тіон, 2,3-дигідро-2,8-диметил-	48,7293	4,52
декаметилтетрасилоксан	49,2591	8,55
Метилтрис(триметилсилокси)силан	49,4698	1,51
4-феніл-Піридо[2,3-d]піримідина	49,5209	1,83

Таблиця 3.17

## Леткі сполуки безсмертника приквіткового квіток

Назва речовини	Час утримування, хв	Частка вмісту в загальній кількості летких сполук, %
1	2	3
1H-Циклопропеазулен, 1a,2,3,4,4a,5,6,7b-октагідро-1,1,4,7-тетраметил-, [1aR-(1a.α.,4α.,4a.β.,7b.α)]	22,4174	0,39
Фенол, 3,5-біс(1,1-диметилетил) -	25,7686	0,21
Дисульфід ди-трет-додецил	26,5474	0,09
Декагідро-4a-метил-1-метилен-7-(1-метилетилиден) -, 4aR-транс нафталін	27,8687	0,10
3-Етил-3-метилгептан	31,2519	0,07
Дисульфід ди-трет-додецил	32,4136	0,09
Тетрадеканова кислота	32,8732	4,96
Тетрадеканова кислота	33,3265	0,98
Додециловий естер бромоцтової кислоти	34,0988	0,30

Продовж. табл. 3.17

1	2	3
Ізопропілміристат	34,3669	0,09
Октиловий естер бензойної кислоти	34,5393	0,23
2-Пентадеканон, 6,10,14-триметил	34,801	0,21
Біс (2-метилпропил)вий естер 1,2-бензендикарбоксилової кислоти	35,3627	0,35
Тетрадеканова кислота	35,4585	0,07
Тетрадеканова кислота	35,5159	0,09
2-Гептанон, 6-метил-	36,2117	0,12
2,6-Диметилбіцикло[3.2.1]октан	36,6075	1,13
Оксациклогептадек-8-ен-2	36,8883	0,50
Циклопентан	37,399	0,16
Етин, фтор	37,5075	0,10
н-Гексадеканова кислота	37,9735	40,46
н-Гексадеканова кислота	38,0884	6,66
н-Гексадеканова кислота	38,3118	1,72
Октодеканал	39,0204	0,49
D-Маннофуранозид, 1-C-(2-оксогексил) -	40,1502	0,13
Гексадециловий естер бромцтової кислоти	40,3864	0,13
Циклогексадекан	40,463	1,21
(R)-(-)-14-Метил-8-гексадецин-1-ол	40,7119	0,16
Фітол	41,1205	0,42
3-(Бут-3-еніл) -циклогексанон	41,5099	1,30
9,12-Октадекадієнова кислота	41,746	19,52
Метилловий естер 7,10,13-гексадекатрієнової кислоти,	41,8482	8,85

Продовж. табл. 3.17

1	2	3
Децил сульфід	42,3077	0,27
Z, Z-10,12-Гексадекадієн-1-ол ацетат	42,5312	0,57
1-Гептадецин	43,5589	0,11
Циклогексан, (3,3-диметилпентил)	43,6355	0,59
2Н-1-Бензопіран-3-карбонітрил, 4-метил-2-оксо	44,5738	0,09
1-гексадеканола	44,8802	0,31
6,7-Дигідро-2-метиламіно-4Н-оксазоло[3,2-а]-1,3,5-триазин-4	45,0271	0,17
Трикозан	45,1356	2,41
1-Азабіцикло[2.2.2]октан-3	45,8505	0,14
Тетраконтан	47,8102	0,83
Гептакозан	48,7294	1,05
Нонакозан	49,5209	2,19

У результаті проведеного дослідження вперше було ідентифіковано в траві безсмертника приквіткового 26 летких сполук, у квітках – 39. При цьому, деякі речовини, зокрема: н-гексадеканова кислота, 9,12-октадеканова кислота та тетрадеканова кислота на хроматограмах показували різний час утримування. Ідентифікація проводилась за даними бібліотеки мас-спектрів NIST 02, WILEY 2007 з використанням програм для ідентифікації AMDIS і NIST.

У результаті визначення частки кожної з ідентифікованих речовин у загальній сумі летючих сполук були отримані дані, що домінуючими леткими сполуками в траві безсмертника приквіткового є: н-гексадеканова кислота (44,48 %), фітол (13,71 %), 9,12-октадеканова кислота (11,21 %) і декаметилтетрасілоксан (8,55 %). У квітках безсмертника приквіткового основними леткими сполуками є: н-гексадеканова



кислота (48,83 %), 9,12-октадеканова кислота (19,52 %), метиловий естер 7,10,13-гексадекатрієнаної кислоти 8,85 % і тетрадеканова кислота 6,10 %.

Інші ідентифіковані сполуки містяться у сировині в значно менших кількостях [41].

### 3.8 Дослідження амінокислот

Попередній аналіз якісного складу амінокислот проводили методом ПХ, амінокислоти ідентифікували за забарвленням плям і величиною  $R_f$  в порівнянні з стандартними зразками. Також ідентифікацію та визначення вмісту амінокислот проводили методом ВЕРХ на хроматографі Agilent 1200, хроматографічна колонка Zorbax AAA (150 мм × 4,6 мм, 3 мкм). Хроматограми вивчення амінокислот сировини наведено на рис. 3.15-3.18, хроматографічна характеристика – у таблиці 3.18. Результати визначення вмісту амінокислот у досліджуваних об'єктах приведено в таблиці 3.19. У таблиці 3.20 представлено частка кожної амінокислот в загальній сумі.

Таблиця 3.18

#### Хроматографічна характеристика амінокислот

Амінокислота	Загальна формула	Молекулярна маса	Величина $R_f \times 100$
1	2	3	4
Аланін**	$C_3H_7NO_2$	89	4
Аргінін**	$C_6H_{14}N_4O_2$	174	20
Аспарагінова кислота**	$C_4H_7NO_4$	133	16
Валін*	$C_5H_{11}NO_2$	117	43
Гістидин**	$C_6H_9N_3O_2$	155	10
Гліцин**	$C_2H_5NO_2$	75	21
Глутамінова кислота**	$C_5H_9NO_4$	147	17

Продовж. табл. 3.18

1	2	3	4
Ізолейцин*	$C_6H_{13}O_2N$	131	72
Лейцин*	$C_6H_{13}NO_2$	146	63
Лізин*	$C_6H_{14}N_2O_2$	146	5
Метіонін*	$C_5H_{11}O_2NS$	149	39
Пролін**	$C_5H_9NO_2$	115	24
Серин**	$C_3H_7NO_3$	105	15
Тирозин**	$C_9H_{11}NO_3$	181	57
Треонін*	$C_4H_9NO_3$	119	18
Фенілаланін*	$C_9H_{11}NO_2$	165	32

Примітки:

1. Рухома фаза: бутанол-оцтова кислота-вода (4:1:2)
2. \* - незамінні амінокислоти;
3. \*\* - замінні амінокислоти

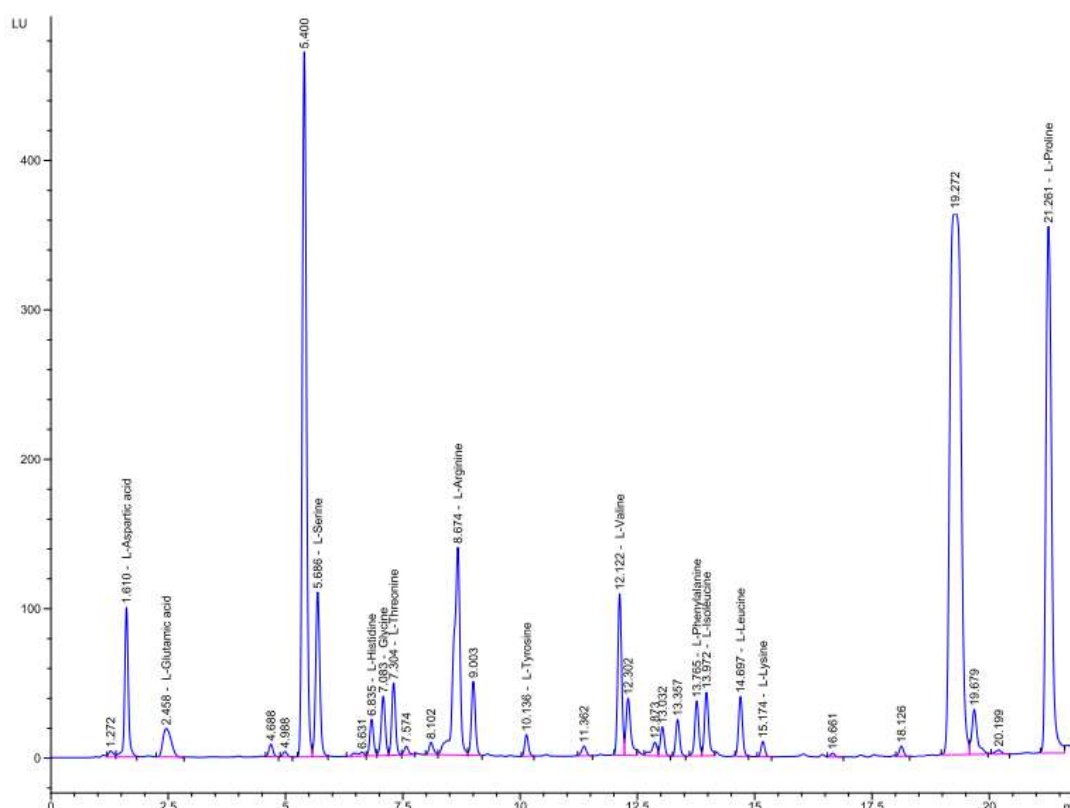


Рис. 3.15 ВЕРХ-хроматограма, отримана в умовах визначення вільних амінокислот у безсмертника приквіткового квітка

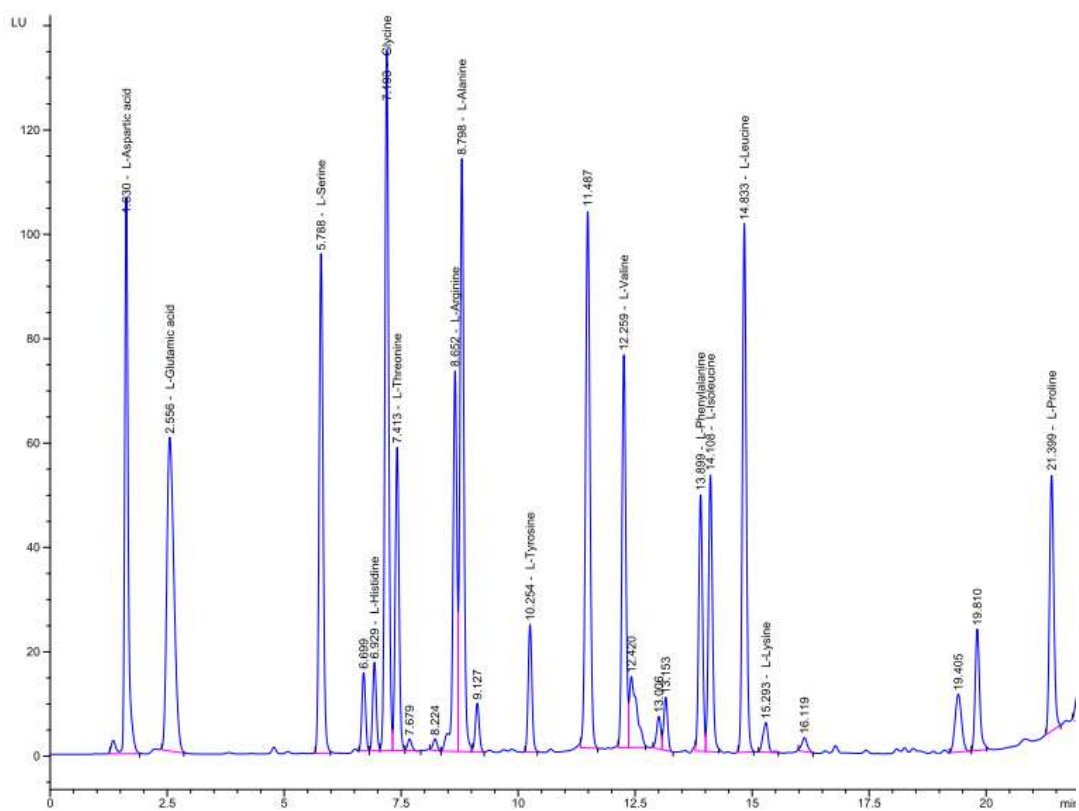


Рис. 3.16 ВЕРХ хроматограма, отримана в умовах визначення загальної кількості амінокислот у безсмертника приквіткового квітках

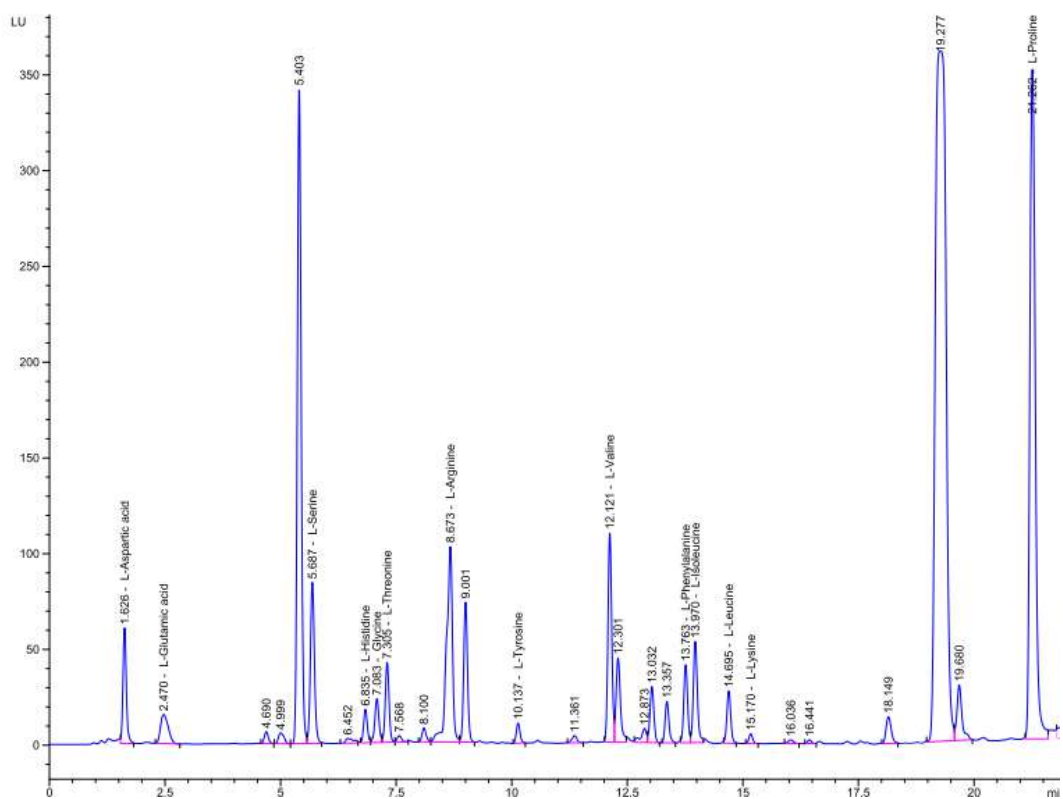


Рис. 3.17 ВЕРХ хроматограма, отримана в умовах визначення вільних амінокислот у безсмертника приквіткового траві

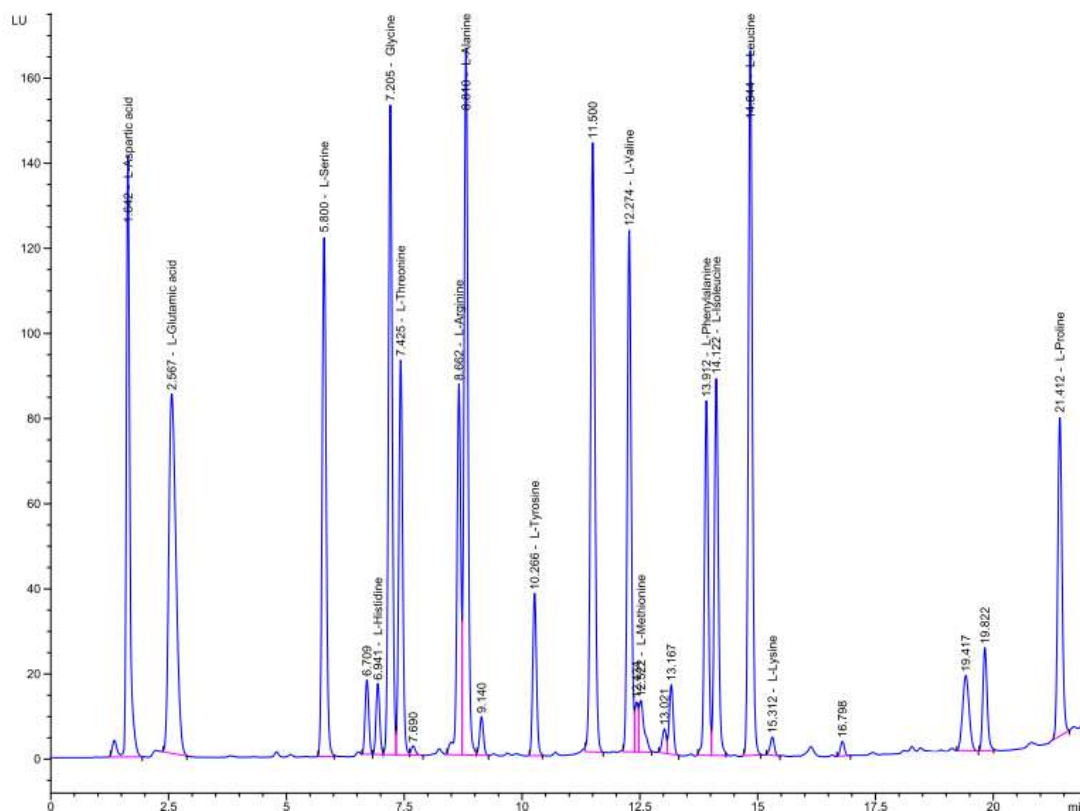


Рис. 3.18 ВЕРХ хроматограма, отримана в умовах визначення загальної кількості амінокислот у безсмертника приквіткового трави

Таблиця 3.19

### Амінокислоти безсмертника приквіткового квіток і трави

Назва амінокислоти	Вміст амінокислот, мг/100 г					
	Вільні		Зв'язані		Загальна кількість	
	квітки	трава	квітки	трава	квітки	трава
1	2	3	4	5	6	7
незамінні амінокислоти						
Валін	32,3	29,6	98,1	195,5	130,4	225,1
Ізолейцин	17,9	19,8	87,3	166,3	105,2	186,1
Лейцин	16,4	10,2	185,5	341,0	201,9	351,2
Лізін	19,1	8,7	46,0	32,5	65,1	41,2
Метіонін	—	—	—	32,5	—	32,5

Продовж. табл. 3.19

1	2	3	4	5	6	7
Треонін	19,9	15,8	99,7	186,9	119,6	202,7
Фенілаланін	19,9	19,6	106,8	209,9	126,7	229,5
Усього незамінних амінокислот	125,5	103,7	623,4	1164,6	748,9	1268,3
замінні амінокислоти						
Аланін	–	–	183,1	280,8	183,1	280,8
Аргінін	128,2	81,7	85,1	178,9	213,3	260,5
Аспарагінова кислота	47,1	24,6	294,1	457,1	341,2	481,8
Гістидин	30,8	20,0	59,4	73,1	90,2	93,1
Гліцин	11,7	6,3	174,6	218,2	186,4	224,6
Глутамінова кислота	28,1	19,3	379,1	586,8	407,2	606,1
Пролін	130,9	140,5	25,0	22,5	155,9	163,0
Серин	44,0	30,2	137,9	216,6	181,9	246,8
Тирозин	8,8	5,9	63,8	113,7	72,6	119,6
Усього замінних кислот	429,6	328,5	1402,1	2147,7	1831,8	2476,3

Таблиця 3.20

**Частка вмісту амінокислоти у квітках і траві безсмертника приквіткового**

Назва амінокислоти	Частка вмісту, %	
	квітки	трава
1	2	3
Незамінні амінокислоти		
Валін	17,41	17,75
Ізолейцин	14,05	14,67

Продовж. табл. 3.20

1	2	3
Лейцин	26,96	27,69
Лізин	8,69	3,25
Метіонін	–	2,56
Треонин	15,97	15,98
Фенілаланін	16,92	18,10
Замінні амінокислоти		
Аланін	10,00	11,34
Аргінін	11,64	10,52
Аспарагінова кислота	18,63	19,46
Гістидин	4,92	3,76
Гліцин	10,18	9,07
Глутамінова кислота	22,23	24,48
Пролін	8,51	6,58
Серин	9,93	9,97
Тирозин	3,96	4,83

У безсмертника приквіткового квітках і траві було ідентифіковано 16 амінокислот: 7 незамінних (треонін, валін, метіонін, лейцин, ізолейцин, фенілаланін, лізин), 6 замінних (аспарагінова кислота, аланін, гліцин, глутамінова кислота, пролін, серин) та 3 частково замінних (аргінін, гістидин, тирозин).

Серед незамінних амінокислот у квітках безсмертника приквіткового найбільшу кількість має лейцин (201,9 мг/100 г), серед замінних амінокислот у квітках домінують глутамінова (407,2 мг/100 г) і аспарагінова кислоти (341,2 мг/100 г).

У траві серед незамінних амінокислот найбільшу кількість мають лейцин (351,2 мг/100 г) і фенілаланін (229,5 мг/100 г), серед замінних амінокислот - глутамінова (606,1 мг/100 г) і аспарагінова (481,8 мг/100 г) кислоти [49].

### 3.9 Дослідження складу та вмісту жирних кислот

Визначення якісного складу та вмісту кислот жирних у безсмертника приквіткового траві та квітках проводили методом ГХ / МС на газовій хромато-мас-спектрометричній системі Agilent 6890N / 5973 inert, колонка капілярна HP-5ms (30 м × 0,25 мм × 0,25 мкм. Хроматограми дослідження жирних кислот сировини наведено на рис. 3.19 і 3.20. Результати аналізу вмісту жирних кислот у досліджуваних об'єктах приведено у таблицях 3.21 і 3.22.

Таблиця 3.21

#### Жирні кислоти безсмертника приквіткового квіток

Назва	Час утримування, хв	Вміст (мг/г)	Частка кожної кислоти, (%)
Ундецилова кислота	Внутрішній стандарт		
Лауринова кислота	5,29	0,11	0,94
Пальмітинова кислота	14,40	3,32	29,32
Лінолева кислота*	18,23	4,10	36,27
$\alpha$ – Ліноленова кислота*	18,37	2,07	18,29
Стеаринова кислота	18,98	0,79	6,98
Арахінова кислота	23,26	0,48	4,27
Бегенова кислота	27,21	0,35	3,06
Лігноцеринова кислота	30,89	0,10	0,87
Усього		11,32	100
Сума ненасичених жирних кислот		6,17	54,5
Сума насичених жирних кислот		5,15	45,5

\* ненасичені жирні кислоти

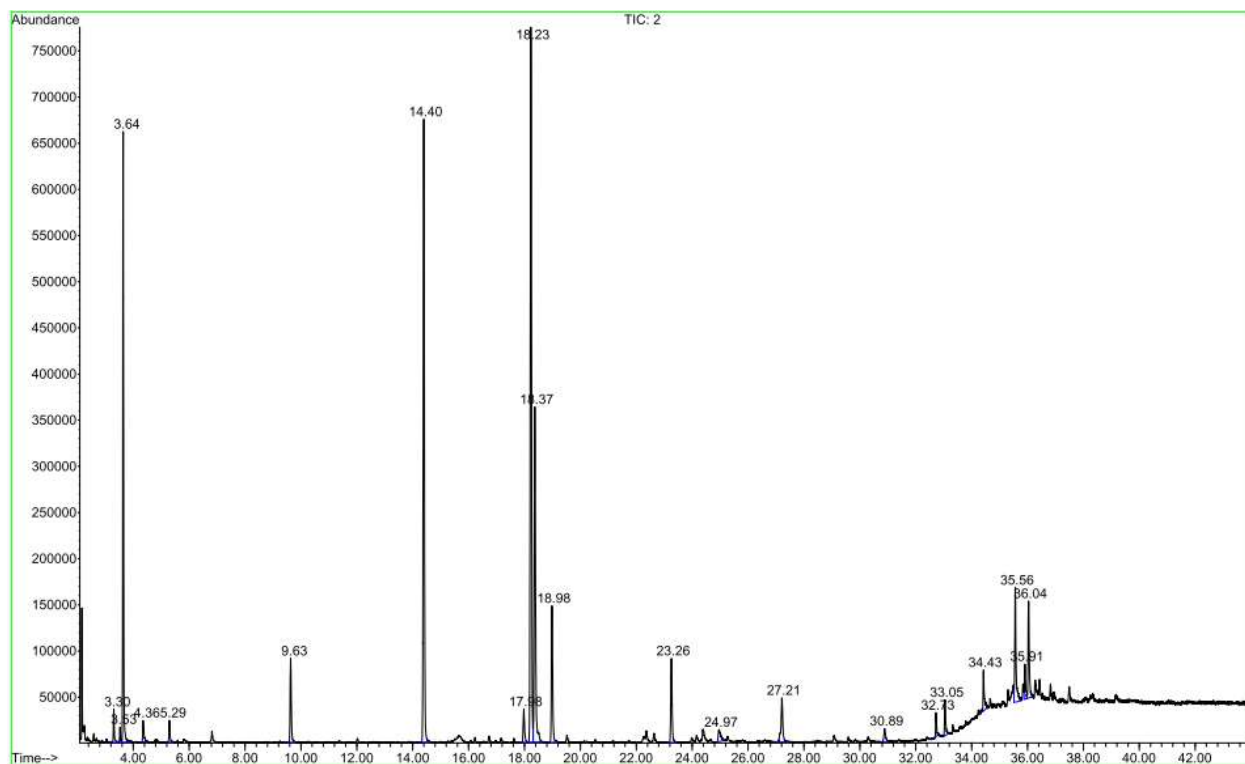


Рис. 3.19 Хроматограма, отримана в умовах визначення жирних кислот у безсмертника приквіткового квітка

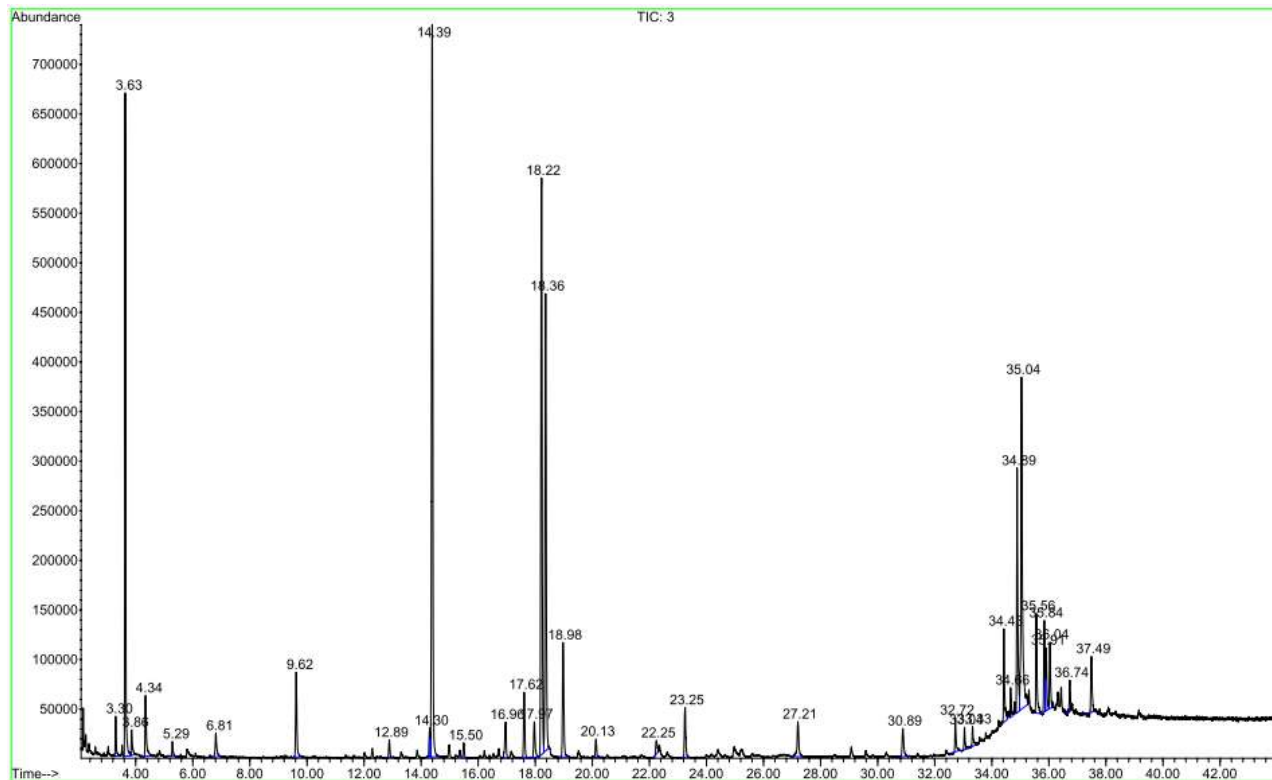


Рис. 3.20 Хроматограма, отримана в умовах визначення жирних кислот у безсмертника приквіткового траві



Таблиця 3.22

**Жирні кислоти безсмертника приквіткового трави**

Назва	Час утримування, хв	Вміст (мг/г)	Частка кожної кислоти, (%)
Ундецилова кислота	Внутренний стандарт		
Лауринова кислота	5,29	0,07	0,65
Лауроолеїнова кислота*	14,30	0,12	1,12
Пальмітинова кислота	14,39	3,61	35,04
Капронова кислота	15,50	0,07	0,71
Лінолева кислота*	18,22	2,85	27,71
$\alpha$ – Ліноленова кислота*	18,37	2,23	21,68
Стеаринова кислота	18,98	0,59	5,70
Арахінова кислота	23,25	0,26	2,48
Бегенова кислота	27,21	0,24	2,29
Лігноцеринова кислота	30,89	0,18	1,71
Церотинова кислота	33,33	0,09	0,91
Усього		10,32	100
Сума ненасичених жирних кислот		5,20	50,38
Сума насичених жирних кислот		5,12	49,61

\* ненасичені жирні кислоти

У результаті проведеного дослідження було виявлено в квітках безсмертника приквіткового 8 жирних кислот, серед яких 2 ненасичені і 6 насичених жирних кислот, у траві – 11 жирних кислот, серед яких 3 ненасичені і 8 насичених. Серед

визначених жирних кислот у квітках безсмертника знаходяться в значних кількостях: з ненасичених – лінолева (4,10 мг/г) і  $\alpha$  – ліноленова (2,07 мг/г) кислоти, з насичених – пальмітинова кислота (3,32 мг/г). У траві безсмертника приквіткового серед ідентифікованих жирних кислот у великих кількостях також представлені вищенаведені кислоти, але в інших кількостях: пальмітинова кислота (3,61 мг/г), з ненасичених – лінолева (2,85 мг/г) і  $\alpha$  – ліноленова (2,23 мг/г) кислоти. Інші визначені жирні кислоти зустрічаються значно в меншій кількості [45].

### 3.10 Вивчення мінеральних речовин

Для визначення якісного складу і вмісту мінеральних речовин та загальної золи у квітках, траві та коренях рослини був використаний атомно–емісійний спектрографічний метод. Ідентифіковані макро– і мікроелементи та їх вміст наведено в таблиці 3.23.

Таблиця 3.23

#### Вміст мінеральних речовин у сировині безсмертника приквіткового

Елемент	Вміст елементів, мг/100 г, сировина		
	трава	квітки	корені
1	2	3	4
Натрій (Na)	375,00	310,00	450,00
Калій (K)	2670,00	1660,00	3880,00
Кальцій (Ca)	960,00	310,00	1350,00
Магній (Mg)	270,00	155,00	375,00
Фосфор (P)	180,00	140,00	220,00
Силіцій (Si)	130,00	50,00	280,00
Ферум (Fe)	23,50	7,80	32,80
Алюміній (Al)	21,40	6,20	25,20

Продовж. табл. 3.23

1	2	3	4
Цинк (Zn)	6,40	3,60	6,70
Купрум (Cu)	2,40	2,10	3,80
Манган (Mn)	8,00	2,10	10,10
Молібден (Mo)	0,053	0,05	0,05
Плюмбум (Pb)	<0,03	<0,03	<0,03
Нікель (Ni)	0,10	0,26	0,36
Стронцій (Sr)	6,40	0,78	6,90

Згідно з отриманими результатами, можна встановити таку закономірність за вмістом елементів у сировині безсмертника приквіткового:

у коренях – K>Ca>Na>Mg> Si > P> >Fe>Al>Mn>Sr>Zn>Cu>Ni>Mo;

у траві: K>Ca>Na>Mg>P>Si>Fe>Al>Mn>Sr=Zn>Cu>Ni>Mo;

у квітках –K>Ca=Na>Mg>P>Si>Fe>Al>Zn>Mn=Cu>Sr>Ni>Mo.

Усі частини рослини: квітки, трава та корені мають однаковий якісний елементний склад, але відрізняються за кількісним показником. Для кожного виду сировини елементи можна розділити за вмістом на чотири групи: перша група – вміст наближується до 1000 мг/100 г і вище; друга – від 100 мг до 1000 мг/100 г; третя – нижче 100 мг/100 г; четверта – нижче 1 мг/100 г. Розподіл вмісту мінералів у різних видах сировини безсмертника приквіткового наведено в таблиці 3.24.

Таблиця 3.24

### Розподіл вмісту мінералів у різних видах сировини безсмертника приквіткового

Групи за вмістом	Види сировини безсмертника приквіткового		
	трава	квітки	корені
1	2	3	4

Продовж. табл. 3.24

1	2	3	4
Близько 1000 мг/100 г	K, Ca	K	K, Ca
100 мг – 1000 мг/100 г	Na, Mg, P, Si	Ca, Na, Mg, P	Na, Mg, Si, P
Менш 100 мг/100 г	Fe, Al, Mn, Zn, Sr, Cu	Si, Fe, Al, Zn, Cu, Mn	Fe, Al, Mn, Sr, Zn, Cu
Нижче 1 мг/100 г	Ni, Mo, Pb	Sr, Ni, Mo, Pb	Ni, Mo, Pb

Згідно аналізу, можна зробити висновок про рівномірний якісний розподіл елементів у сировині. Подальші результати дослідження вмісту мікроелементів свідчать, що корені безсмертника приквіткового містять найбільшу кількість мікроелементів у порівнянні з травою та квітками. Квітки містять найменшу кількість мікроелементів. Загальна сума всіх елементів досліджуваної сировини (мг/100г) складає у траві – 4653,25; у квітках – 2647,89; у коренях – 6835,25 [43].

Серед відомих лікарських рослин безсмертник приквітковий має дуже високий вміст важливих мікронутрієнтів (мг/100г): 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.

### Висновки до розділу 3

1. Вперше проведено комплексне фітохімічне дослідження різних груп БАР у безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*) квітках і траві.

2. Для визначення якісного складу фенольних сполук сировини безсмертника приквіткового використовували хроматографічний та УФ-спектроскопічний аналіз. У результаті проведеного дослідження в сировині безсмертника приквіткового вперше виявлено фенольні сполуки, серед яких

ідентифіковано такі: флаволи – лютеолін, ізо-орієнтин, цинарозид, апігенін; флавоноли – кверцетин, кемпферол; аурони – брактєїн, цернуозид, ауреузидин. Вперше для вивчення та визначення вмісту окремих флавоноїдів було проведено дослідження методом ВЕРХ. У результаті в квітках було ідентифіковано та визначено вміст двох флавоноїдів: кверцетину та лютеоліну. При цьому результати показали, що вміст кверцетину складає 14358,87 мкг/г, в меншій кількості міститься лютеолін – 2091,03 мкг/г. У траві було ідентифіковано та визначено вміст трьох флавоноїдів: кверцетин-3-О-β-D-глюкозиду, кверцетину, лютеоліну. У траві вміст кверцетину складає 7523,81 мкг/г, лютеоліну – 6882,89 мкг/г, кверцетин-3-О-β-D-глюкозиду – 494,16 мкг/г. При визначенні суми флавоноїдів було встановлено що, сума флавоноїдів у траві складає 2,18 (± 0,02) %, у квітках – 1,61 (± 0,01) % в перерахунку на цинарозид і суху сировину.

3. Вперше в сировині безсмертника приквіткового ідентифіковано фенолкарбонові кислоти методами ПХ, ТШХ та ВЕРХ. У результаті аналізу в досліджуваній сировині встановлено наявність 8 фенолкарбонових кислот: галова, гідроксифенілоцтова, кофейна, кумарова, ферулова, синапова, корична та хінна кислоти.

У домінуючій кількості в квітках знаходиться хінна кислота (4981,55 мкг/г та має частку 33,11 % серед ідентифікованих фенолкарбонових кислот), синапова кислота (4500,11 мкг/г, частка 29,91 %) і кумарова кислота (3092,03 мкг/г, частка 20,55 %). У траві серед фенолкарбонових кислот основною є хінна кислота (44257,10 мкг/г, частка серед фенолкарбонових кислот 85,23 %). Інші ідентифіковані фенолкарбонові кислоти містяться в значно менших кількостях.

4. Вперше методом ВЕРХ визначено якісний склад та вміст органічних кислот у сировині безсмертника. У траві і квітках безсмертника приквіткового ідентифіковано 6 органічних кислот: винна кислота, піровинноградна кислота, ізолимонна кислота, лимонна кислота, бурштинова кислота, яблучна кислота. У великій кількості в квітках знаходиться ізолимонна кислота (22979,68 мкг/г, її частка складає 60,87 % від загальної суми ідентифікованих органічних кислот), бурштинова

(7847,18 мкг/г, частка 20,79 %) та лимонна кислоти (2643,01 мкг/г, з часткою 7,00 %). У траві домінуючими органічними кислотами є ізолимонна (67613,38 мкг/г, частка якої від загальної суми органічних кислот складає 59,65 %), яблучна (24917,49 мкг/г, з часткою 21,98 %) і бурштинова кислоти (11515,72 мкг/г, частка, якої складає 10,16 %). Решта органічних кислот представлена в значно менших кількостях: у квітках – 4284,04 мкг/г з часткою 11,35 %, у траві – 9295,70 мкг/г з часткою 8,2 %.

5. Вперше в сировині безсмертника приквіткового методом ГХ/МС досліджено склад вуглеводів. У результаті було виявлено в квітках 12 зв'язаних та 13 вільних вуглеводів: у траві – 10 зв'язаних та 12 вільних вуглеводів. Серед визначених моноцукрів у квітках безсмертника 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 серед ідентифікованих вільних цукрів у значних 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 значно в меншій кількості.

6. Вперше методом ГХ/МС визначено якісний склад компонентів летких сполук сировини безсмертника приквіткового. У результаті проведеного дослідження в траві безсмертника ідентифіковано 26 летких сполук, у квітках - 39. Ідентифікація проводилась по бібліотеці мас-спектрів NIST 02, WILEY 2007 з використанням програм для ідентифікації AMDIS і NIST.

У результаті визначення частки кожної з ідентифікованих речовин у загальній сумі летких сполук встановлено, що домінуючими леткими сполуками в траві безсмертника приквіткового є: н-гексадеканова кислота (44,48 %), фітол (13,71 %), 9,12-октадеканова кислота (11,21 %) і декаметилтетрасілоксан (8,55 %); у квітках – 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 сировині в значно менших кількостях.

7. Методом ВЕРХ вперше проведено дослідження амінокислотного складу сировини безсмертника приквіткового. У квітках і траві було ідентифіковано 16

амінокислот: 7 незамінних (треонін, валін, метіонін, лейцин, ізолейцин, фенілаланін, лізин), 6 замінних (аспарагінова кислота, аланін, гліцин, глютамінова кислота, пролін, серин) та 3 частково замінних (аргінін, гістидин, тирозин). Серед незамінних амінокислот у квітках безсмертника найбільшу кількість має лейцин (201,9 мг/100 г, або частку 26,96% серед ідентифікованих амінокислот), серед замінних амінокислот у квітках домінують глютамінова і аспарагінова кислоти (407,2 мг/100 г, частка 22,23% і 341,2 мг/100 г, частка 18,63% відповідно). У траві серед незамінних амінокислот найбільшу кількість мають лейцин (351,2 мг/100 г, частка 27,69%) і фенілаланін (229,5 мг/100 г частка 18,1%). Серед замінних амінокислот - глютамінова і аспарагінова кислоти (606,1 мг/100 г, частка 24,48%) і (481,8 мг/100 г, частка 19,46% відповідно).

8. Методом ГХ/МС встановлено якісний склад і визначено вміст кислот жирних у траві та квітках безсмертника приквіткового. У квітках були ідентифіковані: лауринова, пальмітинова, лінолева,  $\alpha$  – ліноленова, стеаринова, арахінова, бегенова, лігноцеринова кислоти, у траві виявлені: лауринова, лауроолеїнова, пальмітинова, капронова, лінолева,  $\alpha$  – ліноленова, стеаринова, арахінова, бегенова, лігноцеринова, церотинова кислоти. Серед визначених жирних кислот у квітках знаходяться в значних кількостях такі жирні кислоти: з ненасичених - лінолева (4,10 мг/г) і  $\alpha$  - ліноленова (2,07 мг/г) кислоти, з насичених – пальмітинова (3,32 мг/г). У траві серед ідентифікованих жирних кислот у значних кількостях також представлені вищенаведені кислоти, але в інших кількостях: пальмітинова кислота (3,61 мг/г), з ненасичених - лінолева (2,85 мг/г) і  $\alpha$  - ліноленова (2,23 мг/г) кислоти. Інші визначені жирні кислоти зустрічаються значно в менших кількостях.

9. За допомогою метода атомно-емісійної спектроскопії вперше досліджено мінеральний склад трави, квіток та коренів безсмертника приквіткового. У результаті дослідження було з'ясовано, що сировина має високий вміст важливих мікронутриєнтів (мг/100г): 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.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:*

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. 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).

9. 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).

10. Виды 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. X.: 2018. С. 400–407.*

11. 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.

12. 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.

13. 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.

14. 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.

15. 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.

## РОЗДІЛ 4

### МОРФОЛОГО-АНАТОМІЧНИЙ АНАЛІЗ СИРОВИНИ БЕЗСМЕРТНИКА ПРИКВІТКОВОГО

4.1 Морфологічний аналіз сировини безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*)

4.1.1 Морфологічний аналіз неподрібненої сировини безсмертника приквіткового

Стебло пряме, злегка ребристе від 1 до 10 мм у діаметрі, верхня частина стебла розгалужена, довжина стебла від 20 до 100 см.

Листя чергове, вузьке, ланцетоподібне, еліптичне, зворотньо-ланцетоподібне від 1,5 до 10 см завдовжки і від 0,5 до 3 см завширшки. Стебло і листя світло зеленого кольору, опушені дрібними волосками.

Суцвіття розміром від 2 до 7 см, складається з центрального диска, в якому знаходяться окремі квітки і обгортки з модифікованого листя та приквітників. Обгортка оточує декількома рядами диск і створює блиску, темно-червону оцвітину навколо диска.

Квітки жовтого кольору. На зовнішньому колі диска суцвіття зосереджені одностатеві жіночі квіти, які не мають тичинок. Жіночі квітки мають короткий трубчастоподібний віночок навколо маточки, яка розщеплюється на дві приймочки. У центрі суцвіття в проекції стебла знаходяться двостатеві квітки, які мають довший віночок і п'ять тичинок, з'єднаних у пиляках, і маточка у центрі з однією сім'ябрунькою. Плід сім'янка, плоди гладкі, коричневі, довжиною 2-3 мм, з щетинками.

Елементи трави безсмертника приквіткового представлені на рисунку 4.1.



Рис. 4.1 Елементи трави безсмертника приквіткового

#### 4.1.2 Морфологічний аналіз подрібненої сировини безсмертника приквіткового

Порошок трави сіро-зеленого або зеленого кольору, має специфічний запах, смак – гіркуватий (рис. 4.2 А) .



Порошок квіток – світло-коричневого кольору з червоним відтінком, обумовлені кольором приквітників, запах – специфічний, смак – гіркуватий (рис. 4.2 Б).

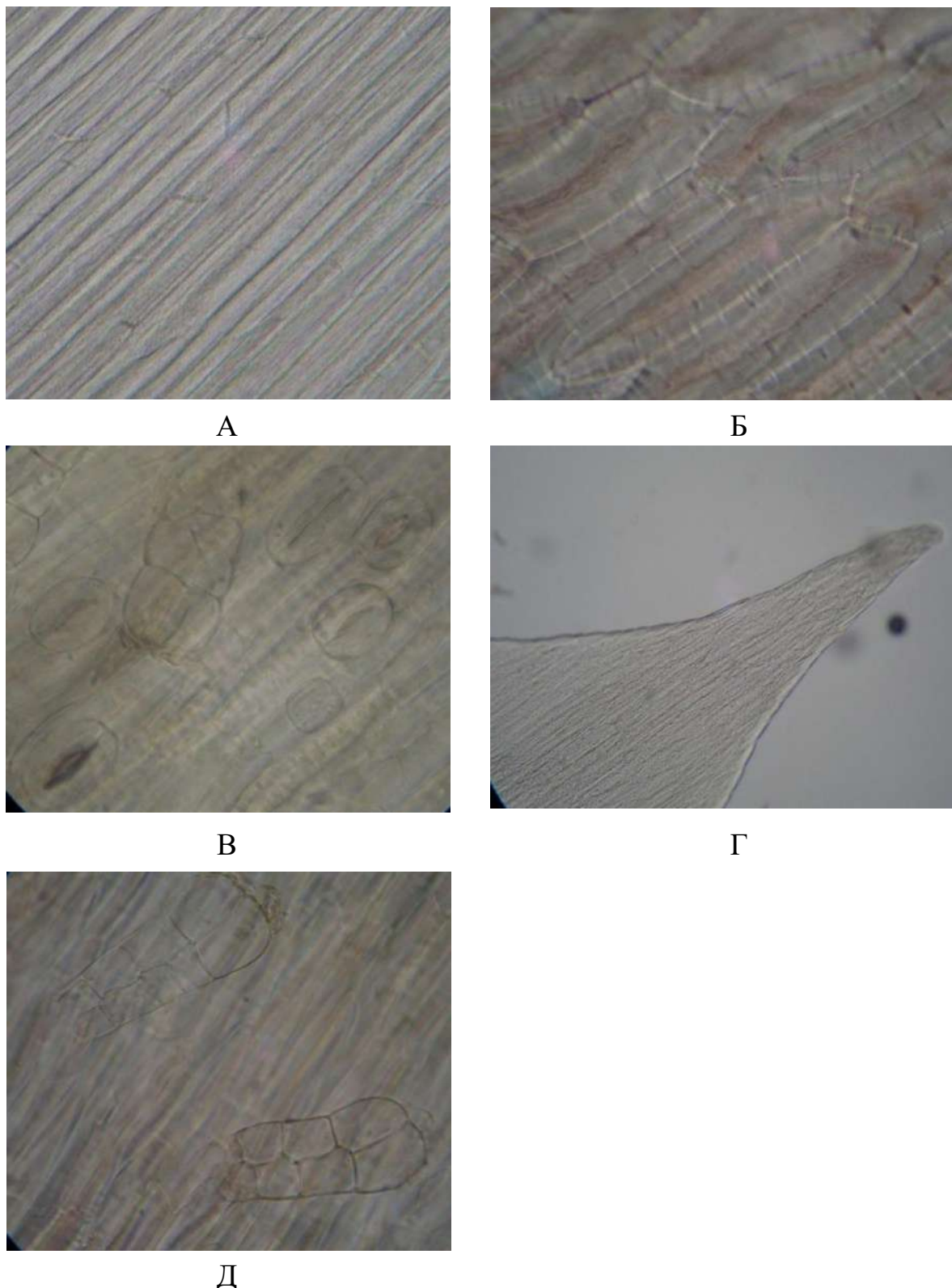


Рис. 4.2 Подрібнена сировина безсмертника приквіткового: А – трава; Б – квітки

#### 4.2 Анатомічний аналіз сировини безсмертника приквіткового

##### *Листочок обгортки (приквітник)*

*Нижня епідерма приквітників, зовнішня* (рис. 4.3). Клітини прозенхімні, прямокутні (рис. 4.3 А), іноді загострені, веретеноподібної форми (рис. 4.3 Б). Продиховий апарат тетрацитного типу, продихи різних розмірів. Залозисті волоски багатоклітинні, дворядні (рис. 4.3 В). Уздовж краю листочка приквітника клітини мають вільний край із загостреною верхівкою, яка спрямована вгору, клітини прозенхімні (рис. 4.3 Г). В основі листочка клітини епідерми прозенхімні та паренхімні, мають дуже потовщені, прямі стінки з добре помітними порами, також наявні залозисті волоски (рис. 4.3 Д).



Д

Рис. 4.3 Нижня епідерма приквітників безсмертника приквіткового: А - прозенхімні прямостінні клітини; Б - загострені клітини, веретеноподібної форми; В - продиховий апарат тетрацитного типу, залозисті волоски; Г - клітини краю приквітника із загостреною верхівкою; Д - клітини основи листочка приквітника, з залозистими волосками

*Верхня епідерма приквітників*, внутрішня (рис. 4.4). Клітини прозенхімні, прямостінні з рівномірно потовщеними оболонками, злегка загострені (веретеноподібні) (рис. 4.4 А).

Ближче до основи довжина клітин зменшується. В основі листочка обгортки клітини паренхімні (рис. 4.4 Б).



А



Б

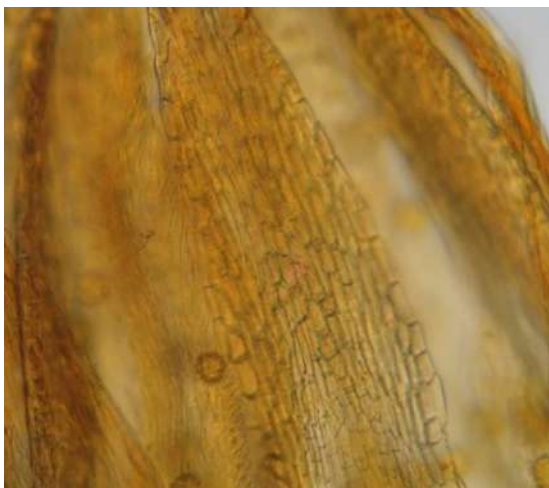
Рис. 4.4 Верхня епідерма приквітників безсмертника приквіткового: А - веретеноподібні клітини з рівномірно потовщеними оболонками; Б - паренхімні клітини основи листочка приквітника

#### *Квітка*

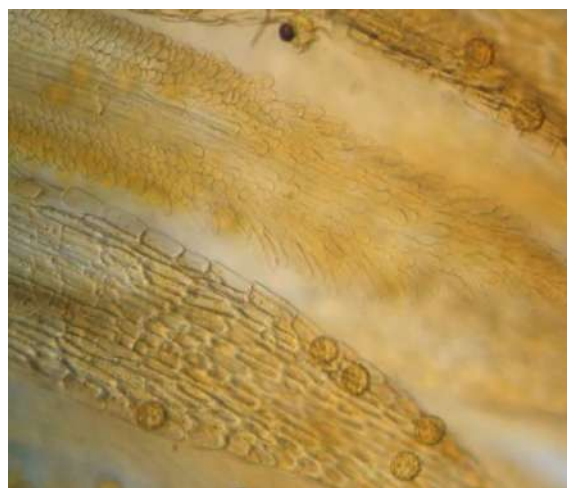
Зовнішня епідерма пелюстки складається з паренхімних, прямостінних, прямокутних клітин (рис 4.5 А). Внутрішня епідерма утворює бахромчасті волоски (сосочкоподібні вирости) (рис 4.5 Б-1; Б-2). Приймочка також покрита бахромчастими волосками (рис 4.5 В). Пелюстки покриті залозистими волосками (дворядні, багатоклітинні) (рис 4.5, Г). Пилок округлий, шипуватий. На верхівці зав'язі чубчик (рис 4.5 Д).

Серед анатомічних елементів квітки зустрічаються волоски летючки, які складаються з прозенхімних, прямостінних клітин, при цьому один край вільний, загострений і утворює шипоподібні вирости (рис 4.5 Е).





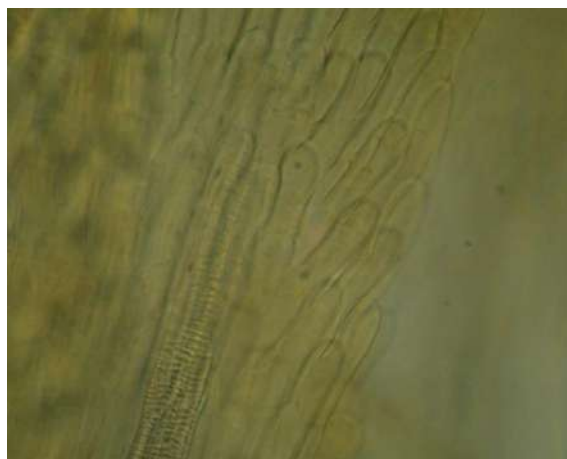
А



Б - 1



Б - 2



В



Г



Д





Е

Рис. 4.5 Квітка: А – зовнішня епідерма пелюстки; Б - внутрішня епідерма пелюстки; В – фрагмент приймочки, покритої бахромчастими волосками; Г - залозистий волосок; Д - зав'язь; Е - волосок летючки

#### *Дослідження будови квітконоса*

Епідерма квітконоса складається з прозенхімних та паренхімних клітин (рис. 4.6 А). На епідермі знаходяться прості волоски з шістьма базальними клітинами, стінки базальних клітин є більш потовщені, термінальна клітина волоска може відпадати, наявні продихи (рис. 4.6 Б). Також на епідермі знаходяться залозисті багатоклітинні волоски (рис. 4.6 В).



А



Б



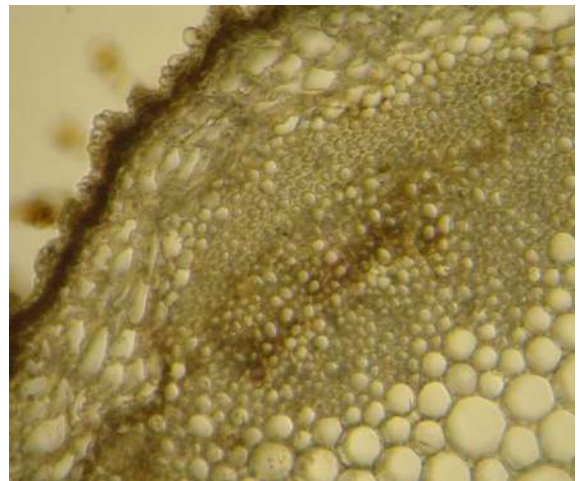
В

Рис. 4.6 Епідерма квітконоса: А – прозенхімні та паренхімні клітини епідерми; Б - прості волоски з шістьма базальними клітинами; В - поперечний зріз квітконоса, залозисті багатоклітинні волоски

На поперечному зрізі квітконос має округлу форму з хвилястим краєм, клітини епідерми округлі та великі. Під епідермою знаходиться шар хлоренхіми, 2-3 шари коленхіматозної паренхіми, клітинні стінки якої потовщені (рис. 4.7 А). Корова паренхіма рихла, клітини великі, різної форми, ендодерма однорядна. Провідна система квітконоса пучкового типу, її будова аналогічна будові верхньої частини стебла (рис. 4.7 Б).



А



Б

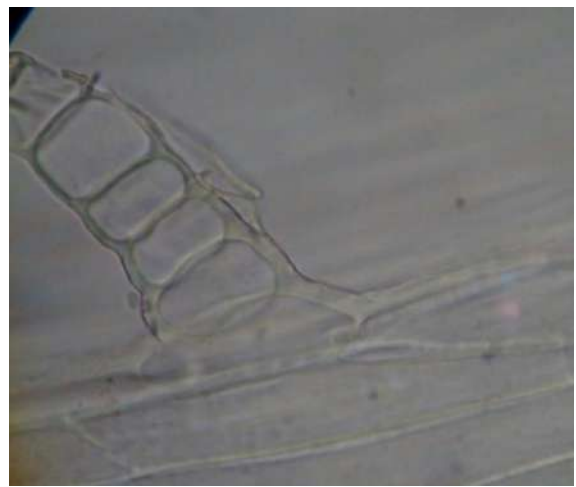
Рис. 4.7 Поперечний зріз квітконоса: А - загальний вигляд; Б - паренхіма, коленхіматозна паренхіма, провідний пучок

### *Дослідження будови стебла*

Епідерма покрита кутикулою, представлена прозенхімними, прямостінними клітинами, наявні продихи (рис. 4.8, А). Епідерма покрита простими бічеподібними волосками з базальними короткими клітинами і однією довгою термінальною клітиною. Місце прикріплення волосків оточене розеткою клітин, одна або дві клітини більш округлі. Основа волосків може бути ширша. Термінальна клітина може відламуватися, при цьому залишаються чотири базальні клітини основи (рис. 4.8 Б). Зустрічаються багатоклітинні дворядні залозисті волоски (рис. 4.8 В, Г).



А



Б



В

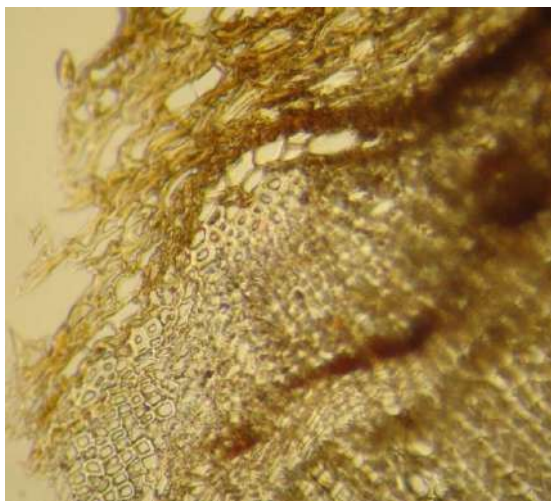


Г

Рис. 4.8 Епідерма стебла безсмертника приквіткового: А - прозенхімні, прямостінні клітини епідерми; Б - бічеподібні волоски; В - багатоклітинні дворядні залозисті волоски; Г - залозисті волоски, вид зверху



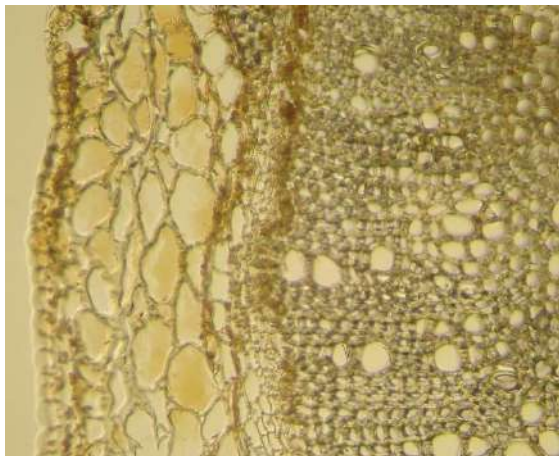
Під епідермою знаходиться 1-2 ряди хлоренхіми. Корова паренхіма представлена клітинами різного розміру, які розташовуються більш пухко з міжклітинниками. В нижній частині стебла (рис. 4.9 А) корова паренхіма містить до 10 рядів клітин, клітини видовжені, чотиригранні, мають більш потовщені стінки з міжклітинниками. Ендодерма одношарова, клітини тонкостінні. У верхній частині стебла (рис. 4.9 Б) і середній частині стебла (рис. 4.9 В) корова паренхіма великоклітинна. У верхній частині стебла під великими судинно-волокнистими пучками видно ділянки кутової коленхіми (3 шари) (рис. 4.9 Г).



А



Б



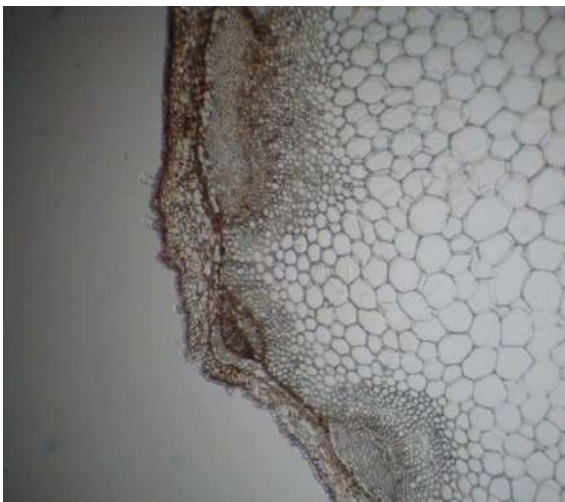
В



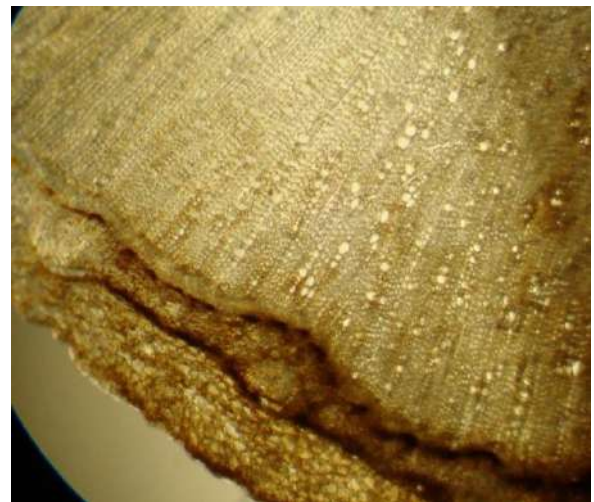
Г

Рис. 4.9 Поперечний зріз стебла, вторинна будова стебла безсмертника приквіткового: А - корова паренхіма нижньої частини стебла; Б - корова паренхіма верхньої частини стебла; В - корова паренхіма середньої частини стебла; Г - кутова паренхіма верхньої частини стебла

Провідна система стебла змінюється в різних зонах стебла. Стебло у верхній частині має пучкову будову, в середній - перехідний тип, у нижній зоні - непучкову будову. В верхній частині - пучковий тип представлений відкритими колатеральними пучками (рис. 4.10 А). Між великими пучками розташовані більш дрібні. У нижній частині стебла, система непучкового типу представлена кільцем флоєми і ксилеми відповідно. Під ендодермою над флоємою розташовані тяжі склеренхіми перициклічного походження (рис. 4.10 Б). Міжпучкова паренхіма складається з клітин, які поступово дерев'яніють, утворюючи лібриформ. Судини спіральні, кільчасті, пористі. Серцевинні промені однорядні. Серцевина великоклітинна, неоднорідна (рис. 4.10 В)



А



Б



В

Рис. 4.10 Поперечний зріз стебла безсмертника приквіткового. Провідна система: А - верхня частина стебла; Б - нижня частина стебла; В - серцевина

### *Дослідження будови листа*

Листова пластина дорзовентрального типу. Верхня епідерма представлена паренхімними, багатокутними клітинами з рівномірно потовщеними прямостінними або злегка звивистими стінками (рис. 4.11 А). Клітини нижньої епідерми паренхімні мають звивисті стінки (рис. 4.11 Б). Клітини верхньої та нижньої епідерми мають потовщення в кутах звивин. Продиховий апарат аномоцитного та анізоцитного типу, листова пластинка має амфістоматичний тип (тобто продихи є з обох боків). На поперечному зрізі листової пластинки видно всі анатомічні структури. Стовпчаста паренхіма однорядна, губчаста паренхіма 5 - 6 рядна, клітини розташовані досить щільно (рис. 4.11 В). Центральна жилка подовжено-овальна, сильно виступає на нижньому боці. У центрі розташований один основний колатеральний пучок і по два маленьких бічних пучки (рис. 4.11 Г). Флоема пучка дрібноклітинна, ксилема добре розвинена. З боку флоєми і ксилеми клітини з більш потовщеними стінками (створення механічної тканини - склеренхіми), у старіших листках - склеренхіма (рис. 4.11 Д). Трихоми (волоски) на листі такі ж, як на стеблі і квітконосі: прості багатоклітинні бічеподібні волоски, дворядні багатоклітинні залозисті волоски. В основі листової пластинки (рис. 4.11 Е), у центральній частині розташований один основний центральний пучок і два бокових латеральних, які розташовані в бічних виступах.



А



Б





В



Г



Д



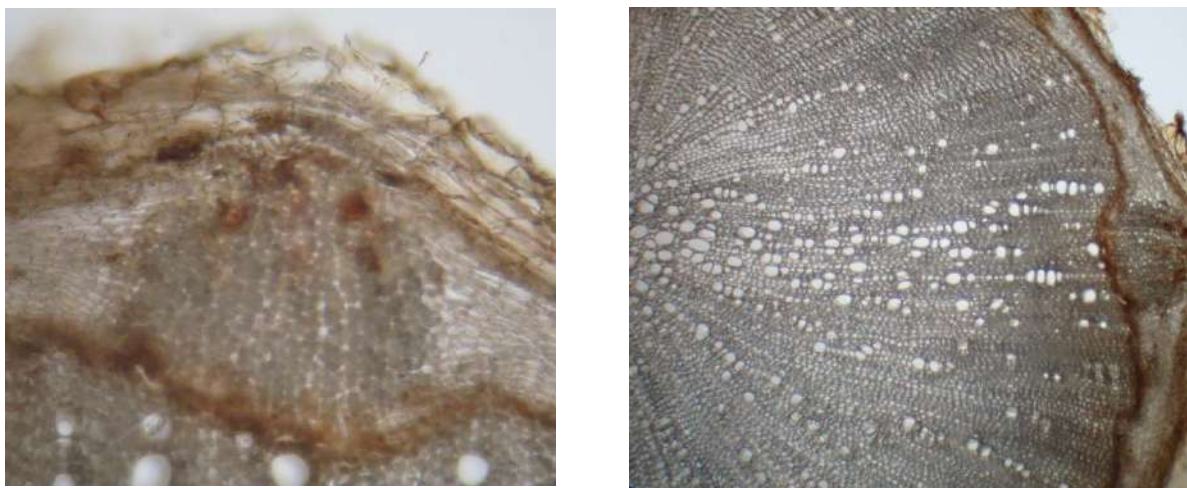
Е

Рис. 4.11 Лист безсмертника приквіткового: А - верхня епідерма; Б - нижня епідерма; В - поперечний зріз листової пластинки; Г - поперечний зріз центральної жилки; Д - поперечний зріз провідного пучка; Е - поперечний зріз основи листової пластинки

### *Корінь*

Корінь вкритий залишками первинної кори. Клітини мезодерми залишаються тонкостінними, їх зовнішні стінки мають коричневий колір. Під ендодермою окремими ділянками розташована вторинна флоема, над якою розташована склеренхіма. Між ділянками флоєми міститься коропа паренхіма (луб'яна паренхіма). Клітини вторинної флоєми поступово дерев'яніють. Кільце камбію

добре виражене (рис. 4.12 А). Вторинна ксилема становить більшу частину кореня. Велика частина - це лібриформ. Судини пористі, спіральні, розташовані поодинокі або невеликими групами. Серцевинні промені не виражені. У центрі кореня - первинна ксилема (рис. 4.2 Б). У нижній частині кореня спостерігається розширення первинної кори [48].



А

Б

Рис. 4.12 Поперечний зріз кореня безсмертника приквіткового: А - провідний пучок; Б - серцевина

#### Висновки до розділу 4

1. Досліджено морфологічні особливості сировини безсмертника приквіткового. Визначено характерні морфологічні ознаки зовнішнього вигляду: форма, колір, розміри органів рослини і особливості будови неподрібненої та подрібненої «повітряно-сухої» сировини.

2. Вивчено анатомічну будову суцвіття, стебла, листя та кореня безсмертника приквіткового. Встановлено діагностичні мікроскопічні ознаки органів рослини. Для суцвіття визначено особливості будови приквітника: характерна веретеноподібна форма клітин епідерми з рівномірно потовщеними оболонками;



клітини, які мають вільний край із загостреною верхівкою; особливості будови залозистих волосків. Для квіток – будова епідерми пелюсток з характерними бахромчастими волосками; будова клітин волосків летючки, у яких один край вільний, загострений і утворює шипоподібні вирости. Для квітконосу та стебла вивчена характерна форма клітин епідерми; наявність фрагментів волосків різного типу; особливості будови провідної системи: квітконос та стебло у верхній частині має пучкову будову, в середній - перехідний тип, у нижній зоні - непучкова будова. Для листя – характерні клітини епідерми, які мають звивисті стінки та потовщення в кутах звивин; будова центральної жилки, яка подовжено-овальна і сильно виступає на нижньому боці; розміщення провідних пучків у центральній жилці та черешку: в центрі розташований один основний колатеральний пучок і по два маленьких бічних пучка; типи продихового апарату. Для кореня – характерно будова клітин мезодерми; розташування вторинної флоєми, склеренхіми та корової паренхіми; будова та розташування судин.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:*

1. Москаленко А. М., Попова Н. В. Особливості анатомічної будови безсмертника приквіткового (*Helichrysum brasyeatum*). *Фітотерапія. Часопис*. 2020. №2. С. 64–74. (Особистий внесок – брав участь в плануванні експерименту, узагальненні результатів та підготовці статті).

## РОЗДІЛ 5

### ОДЕРЖАННЯ СУБСТАНЦІЇ З СИРОВИНИ БЕЗСМЕРТНИКА ПРИКВІТКОВОГО І ВИВЧЕННЯ ФАРМАКОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ

#### 5.1 Дослідження технологічних параметрів сировини безсмертника приквіткового

Важливою умовою при розробці оптимальних методів одержання екстрактів є вивчення технологічних параметрів сировини.

Ці дослідження потрібні для розробки етапів виготовлення лікарського засобу, зокрема при: подрібненні, просіюванні, дозуванні, встановленні витратних норм рослинного матеріалу з метою раціонального підходу до технологічного процесу. Також вивчення технологічних параметрів дозволяє провести оптимальний розрахунок собівартості отриманого екстракту та проаналізувати вартість кожного етапу виготовлення готового продукту.

Однією з найважливіших технологічних властивостей сировини є ступінь подрібнення, яка визначає середній розмір часток. Ця властивість впливає на густину, коефіцієнти поглинання і набухання ЛРС, на швидкість екстрагування та повноту виділення екстрактивних речовин. Але при цьому треба враховувати, що це економічно затратний етап, який може суттєво збільшувати вартість кінцевого продукту.

Питома та об'ємна густина, насипний об'єм сировини до та після усадки є важливішими факторами при розрахунку об'єму завантаження екстракторів. Насипна густина характеризує здатність сировини до утрамбовування.

Визначення технологічних параметрів проводили відповідно до вимог ДФУ [19]. Для трави та квіток безсмертника приквіткового були визначені та проаналізовані: втрата в масі при висушуванні, середній розмір часток, насипна густина до та після усадки, об'ємна густина, коефіцієнт поглинання для води і етанолу 70 %, питома маса, пористість сировини, нарізність шару, вільний об'єм шару.

*Втрата в масі при висушуванні*

Випробування проводили для 5 серії сировини, результати яких представлено у таблиці 5.1, статистична обробка отриманих даних представлена у таблиці 5.2

*Таблиця 5.1*

**Втрата в масі при висушуванні сировини безсмертника приквіткового в перерахунку на абсолютно суху речовину (m=5)**

Показник	Серія сировини	Вид сировини	
		трава	квітки
Втрата в масі, %	10717	8,0127	7,3916
	20817	8,0985	7,4111
	30718	7,9959	7,4005
	40719	7,9993	7,4108
	50819	8,0020	7,3940

*Таблиця 5.2*

**Статистична обробка результатів визначення втрати в масі при висушуванні сировини безсмертника приквіткового**

m	f	$X_i$	$X_{\text{ср}}$	$S^2$	S	P	t(P, f)	Втрата в масі, %	$\epsilon$ , %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Трава безсмертника приквіткового									
5	4	8,0127	8,0216	0,00188546	0,043422	0,95	2,78	8,02±0,06	0,15
		8,0985							
		7,9959							
		7,9993							
		8,0020							

Продовж. табл. 5.2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Квітки безсмертника приквіткового									
5	4	7,3916	7,4016	0,00008325	0,0091239	0,95	2,78	7,40±0,01	0,03
		7,4111							
		7,4005							
		7,4108							
		7,3940							

Таким чином, втрата в масі при висушуванні трави безсмертника приквіткового складає  $8,02 \pm 0,06$  %, квіток –  $7,40 \pm 0,01$  %.

*Визначення середнього розміру часток*

Розмір часток визначає ступень подрібненості сировини і впливає на густину, коефіцієнти поглинання, процес виходу екстрактивних речовин та інші технологічні параметри сировини. Визначення цього показника є необхідним для оцінки якості підготовки сировини до екстракції. Результати дослідження представлено у таблиці 5.3. Статистична обробка отриманих даних представлена у таблиці 5.4.

Таблиця 5.3

**Середній розмір часток сировини безсмертника приквіткового, (m=5)**

Показники	Серія сировини	Вид сировини	
		трава	квітки
Середній розмір часток, мм	10717	1,98	1,96
	20817	1,99	1,98
	30718	2,01	1,97
	40719	1,99	1,99
	50819	2,02	1,97

Таблиця 5.4

**Статистична обробка результатів визначення середнього розміру часток сировини безсмертника приквіткового**

m	f	X <sub>i</sub>	X <sub>сеп</sub>	S <sup>2</sup>	S	P	t(P, f)	Середній розмір часток, мм	ε, %
Трава безсмертника приквіткового									
5	4	1,98	1,99	0,00027	0,016431677	0,95	2,78	2,00±0,02	2,29
		1,99							
		2,01							
		1,99							
		2,02							
Квітки безсмертника приквіткового									
5	4	1,96	1,97	0,00013	0,011401754	0,95	2,78	1,97±0,02	1,61
		1,98							
		1,97							
		1,99							
		1,97							

*Визначення питомої маси сировини*

Питома маса являє собою відношення маси абсолютно сухої подрібненої сировини до об'єму рослинної тканини. Питома маса є важливим технологічним показником.

Результати дослідження представлено в таблиці 5.5. Статистична обробка отриманих даних представлена в таблиці 5.6.

Таблиця 5.5

**Питома маса сировини безсмертника приквіткового, (m=5)**

Показники	Серія сировини	Вид сировини	
		трава	квітки
Питомна маса, г/см <sup>3</sup>	10717	1,1405	1,3501
	20817	1,1394	1,3513
	30718	1,1392	1,3551
	40719	1,1392	1,3595
	50819	1,1408	1,3589

Таблиця 5.6

**Статистична обробка результатів визначення питомої масі сировини  
безсмертника приквіткового**

m	f	X <sub>i</sub>	X <sub>сер</sub>	S <sup>2</sup>	S	P	t(P, f)	Питома маса, г/см <sup>3</sup>	ε, %
Трава безсмертника приквіткового									
5	4	1,1405	1,1398	5,78238E-07	0,00076042	0,95	2,78	1,14±0,01	0,19
		1,1394							
		1,1392							
		1,1393							
		1,1408							
Квітки безсмертника приквіткового									
5	4	1,3501	1,3549	1,8397E-05	0,00428917	0,95	2,78	1,36±0,01	0,88
		1,3513							
		1,3551							
		1,3595							
		1,3589							

У результаті дослідження було визначено, що питома маса для трави безсмертника приквіткового складає  $1,14 \pm 0,01$  г/см<sup>3</sup>, для квіток –  $1,36 \pm 0,01$  г/см<sup>3</sup>.

*Визначення насипної густини сировини до і після усадки*

Показник насипного об'єму характеризує здатність рослинного матеріалу займати певний об'єм і змінювати його після усадки.

Насипна густина являє собою відношення маси подрібненої сировини з природною або наведеною вологістю до повного об'єму, що займає сировина разом з порами часток та вільним об'ємом між ними.

Результати представлено в таблиці 5.7, статистична обробка даних – у таблицях 5.8 і 5.9.

Таблиця 5.7

**Насипна густина сировини безсмертника приквіткового, (m=5)**

Показники	Серія сировини	Вид сировини	
		трава	квітки
Насипна густина, г/см <sup>3</sup>	10717	0,1998	0,1551
	20817	0,2006	0,1517
	30718	0,1979	0,1546
	40719	0,2018	0,1533
	50819	0,2024	0,1557
Насипна густина після усадки, г/см <sup>3</sup>	10717	0,2607	0,2087
	20817	0,2574	0,2097
	30718	0,2537	0,2072
	40719	0,2578	0,2082
	50819	0,2567	0,2088

Таблиця 5.8

**Статистична обробка результатів визначення насипної густини сировини  
безсмертника приквіткового до усадки**

m	f	X <sub>i</sub>	X <sub>ср</sub>	S <sup>2</sup>	S	P	t(P, f)	Насипна густина, г/см <sup>3</sup>	ε, %
Трава безсмертника приквіткового									
5	4	0,1998	0,2005	3,14E-06	0,001772	0,95	2,78	0,20±0,02	2,46
		0,2006							
		0,1979							
		0,2018							
		0,2024							
Квітки безсмертника приквіткового									
5	4	0,1551	0,1541	0,000002552	0,001597	0,95	2,78	0,15±0,02	2,88
		0,1517							
		0,1546							
		0,1533							
		0,1557							

Таблиця 5.9

**Статистична обробка результатів визначення насипної густини сировини  
безсмертника приквіткового після усадки.**

m	f	X <sub>i</sub>	X <sub>ср</sub>	S <sup>2</sup>	S	P	t(P, f)	Насипна густина після усадки, г/см <sup>3</sup>	ε, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10



Продовж. табл. 5.9

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Трава безсмертника приквіткового									
5	4	0,2607	0,2572	0,000015103	0,003886258	0,95	2,78	0,26±0,03	2,70
		0,2574							
		0,2537							
		0,2578							
		0,2567							
Квітки безсмертника приквіткового									
5	4	0,2087	0,2085	8,37E-07	0,000914877	0,95	2,78	0,21±0,01	1,22
		0,2097							
		0,2072							
		0,2082							
		0,2088							

Таким чином насипна густина сировини безсмертника приквіткового до усадки для трави складає  $0,20 \pm 0,02$  г/см<sup>3</sup>, для квіток –  $0,15 \pm 0,02$  г/см<sup>3</sup>; після усадки – для трави  $0,26 \pm 0,03$  г/см<sup>3</sup>, для квіток –  $0,21 \pm 0,01$  г/см<sup>3</sup>.

#### Визначення об'ємної густини сировини

Об'ємна густина ( $d_0$ ) являє собою відношення маси неподрібненої сировини з природною або наведеною вологістю до її повного об'єму, що вміщує пори, щілини та капіляри, заповнені повітрям. Результати представлено у таблиці 5.10, статистична обробка даних – у таблиці 5.11.

Таблиця 5.10

#### Об'ємна густина сировини безсмертника приквіткового, (m=5)

Показники	Серія сировини	Вид сировини	
		трава	квітки
1	2	3	4

Продовж. табл. 5.10

1	2	3	4
Об'ємна густина, г/см <sup>3</sup>	10717	0,6129	0,8653
	20817	0,6092	0,8612
	30718	0,6217	0,8573
	40719	0,6123	0,8628
	50819	0,6116	0,8537

Таблиця 5.11

**Статистична обробка результатів визначення об'ємної густини сировини  
безсмертника приквіткового**

m	f	X <sub>i</sub>	X <sub>сеп</sub>	S <sup>2</sup>	S	P	t(P, f)	об'ємна густина, г/см <sup>3</sup>	ε, %
Трава безсмертника приквіткового									
5	4	0,6129	0,6135	2,2783E-05	0,004773154	0,95	2,78	0,61±0,01	2,16
		0,6092							
		0,6217							
		0,6123							
		0,6116							
Квітки безсмертника приквіткового									
5	4	0,8653	0,8601	2,1083E-05	0,004591623	0,95	2,78	0,86±0,01	1,48
		0,8612							
		0,8573							
		0,8628							
		0,8537							

У результаті визначення об'ємної густини сировини безсмертника приквіткового було встановлено, що для трави вона складає  $0,61 \pm 0,01$  г/см<sup>3</sup>, для квіток –  $0,86 \pm 0,01$  г/см<sup>3</sup>.

*Визначення коефіцієнту водопоглинання*

Показник водопоглинання необхідний для розрахунку об'єму екстрагента, який використовується для виготовлення екстракту.

Цей показник залежить від багатьох факторів: ступеня подрібнення сировини, пористості, вмісту вологи, виду ЛРС та екстрагента, вмісту екстрактивних речовин тощо.

Враховуючи вплив багатьох факторів, користуватись середніми табличними значеннями коефіцієнту не завжди раціонально. Результати дослідження представлені в таблицях 5.12 і 5.13, статистична обробка даних – у таблиці 5.14

*Таблиця 5.12*

**Визначення коефіцієнта водопоглинання трави безсмертника приквіткового, (n=5)**

Серія сировини	Маса наважки трави , г	Об'єм води очищеної в мірному циліндрі, мл	Об'єм води очищеної після настоювання і фільтрування, мл	Різниця об'ємів	Коефіцієнт водопоглинання
10717	9,5602	100,00	48,70	51,30	5,3660
20817	9,4236	100,00	49,50	50,50	5,3588
30718	9,5200	100,00	49,00	51,00	5,3573
40719	9,4464	100,00	49,30	50,70	5,3671
50819	9,5256	100,00	48,90	51,10	5,3645

Таблиця 5.13

**Визначення коефіцієнта водопоглинання квіток безсмертника  
приквіткового, (m=5)**

Серія сировини	Маса наважки квіток, г	Об'єм води очищеної в мірному циліндрі, мл	Об'єм води очищеної після настоювання і фільтрування, мл	Різниця об'ємів	Коефіцієнт водопоглинання
10717	9,7524	100,00	41,50	58,50	5,9985
20817	9,9267	100,00	40,30	59,70	6,0141
30718	9,8636	100,00	40,70	59,30	6,0120
40719	9,9875	100,00	40,20	59,80	5,9875
50819	9,8034	100,00	41,00	50,00	6,0183

Таблиця 5.14

**Статистична обробка результатів визначення коефіцієнта  
водопоглинання сировини безсмертника приквіткового**

m	f	$X_i$	$X_{\text{сер}}$	$S^2$	S	P	t(P, f)	Коефіцієнт водопоглинання	$\varepsilon, \%$
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Трава безсмертника приквіткового									
5	4	5,3660	5,3627	1,9463E-05	0,00441169	0,95	2,78	5,36±0,01	0,23
		5,3588							
		5,3573							
		5,3671							
		5,3645							

Продовж. табл. 5.14

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Квітки безсмертника приквіткового									
5	4	5,9985	6,0061	0,00016284	0,01276096	0,95	2,78	6,01±0,02	0,59
		6,0141							
		6,0120							
		5,9875							
		6,0183							

Таким чином коефіцієнт водопоглинання для трави безсмертника приквіткового складає  $5,36 \pm 0,01$ , для квіток –  $6,01 \pm 0,02$ .

*Визначення коефіцієнта поглинання для етанолу 70%*

Результати представлені в таблицях 5.15 і 5.16, статистична обробка даних – у таблиці 5.17.

Таблиця 5.15

**Визначення коефіцієнта поглинання 70 % етанолом трави безсмертника приквіткового, (n=5)**

Серія сировини	Маса наважки трави, г	Об'єм 70% етанолу в мірному циліндрі, мл	Об'єм 70% етанолу після настоювання, мл	Різниця об'ємів	Коефіцієнт поглинання
10717	10,2711	100,00	67,50	32,50	3,1642
20817	10,0348	100,00	68,30	31,70	3,1590
30718	10,1854	100,00	67,80	32,20	3,1620
40719	19,9513	100,00	68,50	31,50	3,1654
50819	10,0712	100,00	68,20	31,80	3,1575

Таблиця 5.16

**Визначення коефіцієнта поглинання 70% етанолом квіток безсмертника приквіткового, (n=5)**

Серія сировини	Маса наважки квіток, г	Об'єм 70% етанолу в мірному циліндрі, мл	Об'єм 70% етанолу після настоювання, мл	Різниця об'ємів	Коефіцієнт поглинання
10717	10,0807	100,00	61,00	39,00	3,8688
20817	9,8683	100,00	62,00	38,00	3,8507
30718	10,0247	100,00	61,50	38,50	3,8405
40719	9,7776	100,00	62,10	37,90	3,8762
50819	9,9295	100,00	61,70	38,30	3,8572

Таблиця 5.17

**Статистична обробка результатів визначення коефіцієнта поглинання 70 % етанолом сировини безсмертника приквіткового**

m	f	X <sub>i</sub>	X <sub>сеп</sub>	S <sup>2</sup>	S	P	t(P, f)	Коефіцієнт поглинання	ε, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Трава безсмертника приквіткового									
5	4	3,1642	3,1616	0,000011232	0,003351418	0,95	2,78	3,16±0,01	0,30
		3,1590							
		3,1620							
		3,1654							
		3,1575							

Продовж. табл. 5.17

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Квітки безсмертника приквіткового									
5	4	3,8688	3,8587	0,000201437	0,01419285	0,95	2,78	3,86±0,02	1,02
		3,8507							
		3,8405							
		3,8762							
		3,8572							

Коефіцієнт поглинання для етанолу 70 % для трави безсмертника приквіткового складає  $3,16 \pm 0,01$ , для квіток –  $3,86 \pm 0,02$ .

#### *Визначення пористості сировини*

Цей показник сировини вказує на величину внутрішнього вільного простору часток сировини і визначається, як відношення різниці між питомою та об'ємною масою до питомої маси.

Результати розрахунків представлено у таблиці 5.18, статистична обробка даних – у таблиці 5.19.

Таблиця 5.18

#### **Визначення пористості сировини безсмертника приквіткового, (m=5)**

Показники	Серія сировини	Вид сировини	
		трава	квітки
1	2	3	4
Питома маса, г/см <sup>3</sup> , <i>dy</i>	10717	1,1405	1,3501
	20817	1,1394	1,3513
	30718	1,1392	1,3551
	40719	1,1392	1,3595
	50819	1,1408	1,3589

Продовж. табл. 5.18

1	2	3	4
Об'ємна густина трави, г/см <sup>3</sup> , до	10717	0,6129	0,8653
	20817	0,6092	0,8612
	30718	0,6217	0,8573
	40719	0,6123	0,8628
	50819	0,6116	0,8537
Пористість трави	10717	0,4626	0,3591
	20817	0,4653	0,3627
	30718	0,4543	0,3674
	40719	0,4625	0,3654
	50819	0,4639	0,3718

Таблиця 5.19

**Статистична характеристика результатів визначення пористості  
сировини безсмертника приквіткового**

m	f	X <sub>i</sub>	X <sub>сеп</sub>	S <sup>2</sup>	S	P	t(P, f)	Пористість сировини	ε, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Трава безсмертника приквіткового									
5	4	0,4626	0,4617	4,9742E-05	0,007052801	0,95	2,78	0,46±0,02	2,60
		0,4653							
		0,4543							
		0,4625							
		0,4639							



Продовж. табл. 5.19

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Квітки безсмертника приквіткового									
5	4	0,3591	0,3653	2,2967E-05	0,00479239	0,95	2,78	0,37±0,01	3,65
		0,3627							
		0,3674							
		0,3654							
		0,3718							

Пористість для трави безсмертника приквіткового складає  $0,46 \pm 0,02$ , для квіток -  $0,37 \pm 0,01$ .

#### Визначення нарізності шару

Цей показник характеризує величину вільного простору між частинками рослинного матеріалу і визначається, як відношення різниці між об'ємною та насипною густиною до об'ємної густини. Розрахунки представлено в таблиці 5.20, статистична обробка даних – у таблиці 5.21.

Таблиця 5.20

#### Визначення нарізності сировини безсмертника приквіткового, (m=5)

Показники	Серія сировини	Вид сировини	
		трава	квітки
1	2	3	4
Об'ємна густина, г/см <sup>3</sup>	10717	0,6129	0,8653
	20817	0,6092	0,8612
	30718	0,6217	0,8573
	40719	0,6123	0,8628
	50819	0,6116	0,8537

Продовж. табл. 5.20

1	2	3	4
Насипна густина, г/см <sup>3</sup>	10717	0,1998	0,1551
	20817	0,2006	0,1517
	30718	0,1979	0,1546
	40719	0,2018	0,1533
	50819	0,2024	0,1557
Нарізність шару	10717	0,6740	0,8186
	20817	0,6707	0,8239
	30718	0,6817	0,8197
	40719	0,6704	0,8223
	50819	0,6691	0,8176

Таблиця 5.21

## Статистична обробка результатів визначення нарізності сировини

m	f	X <sub>i</sub>	X <sub>сеп</sub>	S <sup>2</sup>	S	P	t(P, f)	Нарізність	ε, %
Трава безсмертника приквіткового									
5	4	0,6740	0,6732	2,58834E-05	0,005087574	0,95	2,78	0,67±0,01	2,10
		0,6707							
		0,6817							
		0,6704							
		0,6691							
Квітки безсмертника приквіткового									
5	4	0,8208	0,8208	5,75761E-06	0,0024	0,95	2,78	0,82±0,01	0,81
		0,8239							
		0,8197							
		0,8223							
		0,8176							

Таким чином, нарізність для трави безсмертника приквіткового складає  $0,67 \pm 0,01$ , для квіток -  $0,82 \pm 0,03$ .

*Визначення вільного об'єму шару*

Це об'єм вільного простору в одиниці сировинного матеріалу визначається як відношення різниці між питомою масою і насипною густиною до питомої маси. Результати дослідження представлено у таблиці 5.22, статистична обробка – у таблиці 5.23.

*Таблиця 5.22*

**Визначення вільного об'єму шару сировини безсмертника приквіткового, (m=5)**

Показники	Серія сировини	Вид сировини	
		трава	квітки
Питомна маса, г/см <sup>3</sup>	10717	1,1405	1,3501
	20817	1,1394	1,3513
	30718	1,1392	1,3551
	40719	1,1392	1,3595
	50819	1,1408	1,3589
Насипна густина, г/см <sup>3</sup>	10717	0,1998	0,1551
	20817	0,2006	0,1517
	30718	0,1979	0,1546
	40719	0,2018	0,1533
	50819	0,2024	0,1557
Вільний об'єм шару	10717	0,8248	0,8851
	20817	0,8239	0,8877
	30718	0,8263	0,8859
	40719	0,8229	0,8872
	50819	0,8226	0,8854

Таблиця 5.23

**Статистична обробка результатів визначення вільного об'єму шару  
сировини безсмертника приквіткового**

m	f	$X_i$	$X_{\text{сер}}$	$S^2$	S	P	t(P, f)	Вільний об'єм шару	$\varepsilon, \%$
Трава безсмертника приквіткового									
5	4	0,8248	0,8241	2,28602E-06	0,001511959	0,95	2,78	0,82±0,01	0,51
		0,8239							
		0,8263							
		0,8229							
		0,8226							
Квітки безсмертника приквіткового									
5	4	0,8851	0,8863	1,31504E-06	0,001146751	0,95	2,78	0,89±0,01	0,36
		0,8877							
		0,8859							
		0,8872							
		0,8854							

Таким чином вільний об'єм шару для трави безсмертника приквіткового складає  $0,82 \pm 0,01$ , для квіток –  $0,89 \pm 0,01$ .

*Визначення загальної золи сировини безсмертника приквіткового*

Результати визначення загальної золи в досліджуваних об'єктах наведено у таблиці 5.24. Статистична обробка результатів дослідження представлена у таблиці 5.25.

Об'єднані результати вивчення технологічних параметрів сировини безсмертника приквіткового представлено у таблиці 5.26.

Таблиця 5.24

**Вміст загальної золи в сировині безсмертника приквіткового**

Номер проби	вміст загальної золи, %	
	трава	квітки
1	10,76	5,19
2	10,71	5,21
3	10,82	5,18
4	10,79	5,19
5	10,73	5,18

Таблиця 5.25

**Статистична обробка результатів визначення загальної золи у сировині безсмертника приквіткового**

m	f	X <sub>i</sub>	X <sub>сеп</sub>	S <sup>2</sup>	S	P	t(P, f)	Кількісний Вміст, %	ε, %
Трава безсмертника приквіткового									
5	4	10,76	10,76	0,00147	0,038340579	0,95	2,78	10,76±0,05	0,99
		10,72							
		10,81							
		10,79							
		10,73							
Квітки безсмертника приквіткового									
5	4	5,19	5,19	0,00015	0,012247449	0,95	2,78	5,19±0,02	0,66
		5,21							
		5,18							
		5,19							
		5,18							

Таблиця 5.26

**Технологічні параметри  
сировини безсмертника приквіткового**

Технологічний параметр	Вид сировини	
	Трава	Квітки
Втрата в масі при висушуванні, %	8,02±0,06	7,40±0,01
Середній розмір часток, мм	2,00±0,02	1,97±0,02
Питома маса, $d_y$ , г/см <sup>3</sup>	1,14±0,01	1,36±0,01
Насипна густина:		
- до усадки, $d_n$ , г/см <sup>3</sup>	0,20±0,02	0,15±0,03
- після усадки, $d_{nv}$ , г/см <sup>3</sup>	0,26±0,03	0,21±0,01
Об'ємна густина, $d_0$ , г/см <sup>3</sup>	0,61±0,01	0,86±0,01
Коефіцієнт водопоглинання, $K_B$	5,36±0,01	6,01±0,02
Коефіцієнт поглинання 70 % етанол, $K_{сп70\%}$	3,16±0,01	3,86±0,02
Пористість сировини, $\rho_b$	0,46±0,01	0,37±0,01
Нарізність сировини, $\Pi_c$	0,67±0,01	0,82±0,03
Вільний об'єм шару, $V$	0,82±0,01	0,89±0,01
Загальна зола, %	10,76±0,05	5,19±0,02

*Визначення екстрактивних речовин при застосуванні різних екстрагентів*

Для визначення оптимального екстрагента при одержанні екстракту з урахуванням показника за кількістю екстрактивних речовин, було проведено екстракцію з застосуванням води, етанолу 40%, 70 %, 96 %.

Дослідження проводили відповідно до методики з ідентифікації ЛРС [59]. Результати дослідження представлені в таблиці 5.27, статистична обробка отриманих даних – у таблицях 5.28 – 5.31.

Таблиця 5.27

## Екстрактивні речовини у сировині безсмертника приквіткового, (m = 5)

Серія сировини	Вихід екстрактивних речовин, %							
	трава				квітки			
	вода	40 %	70 %	96 %	Вода	40 %	70 %	96 %
10717	20,0903	22,2342	26,7645	16,8731	19,1532	21,7609	25,0024	14,3153
20817	20,1254	22,1995	26,9103	16,9081	19,0995	21,7498	25,1129	14,2845
30718	20,1109	22,2192	26,5162	16,8872	19,1229	21,7518	24,7721	14,2904
40719	20,1087	22,2034	26,8355	16,8809	19,1438	21,7498	24,9204	14,3092
50819	20,1029	22,2390	26,8143	16,8798	19,1699	21,7528	25,2149	14,2997

Таблиця 5.28

## Метрологічна характеристика результатів визначення екстрактивних речовин сировини безсмертника приквіткового, екстрагент: вода очищена

m	f	X <sub>i</sub>	X <sub>сер</sub>	S <sup>2</sup>	S	P	t(P, f)	Екстрактивні речовини, %	ε, %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Трава безсмертника приквіткового									
5	4	20,0903	20,1076	0,00016258	0,0127506	0,95	2,78	20,11±0,25	1,83
		20,1254							
		20,1109							
		20,1087							
		20,1029							
Квітки безсмертника приквіткового									

Продовж. табл. 5.28

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
5	4	19,1532	19,1378	0,0007481	0,027352	0,95	2,78	19,14±0,31	2,21
		19,0995							
		19,1229							
		19,1438							
		19,1699							

Таблиця 5.29

**Метрологічна характеристика результатів визначення екстрактивних речовин сировини безсмертника приквіткового, екстрагент: етанол 40 %**

m	f	X <sub>i</sub>	X <sub>сеп</sub>	S <sup>2</sup>	S	P	t(P, f)	Екстрактивні речовини, %	ε, %
Трава безсмертника приквіткового									
5	4	22,2342	22,2191	0,0003137	0,0177107	0,95	2,78	22,22±0,19	1,15
		22,1995							
		22,2192							
		22,2034							
		22,2390							
Квітки безсмертника приквіткового									
5	4	21,7609	21,7530	2,1092E-05	0,0045926	0,95	2,78	21,75±0,15	1,16
		21,7498							
		21,7518							
		21,7498							
		21,7528							



Таблиця 5.30

**Метрологічна характеристика результатів визначення екстрактивних речовин сировини безсмертника приквіткового, екстрагент: етанол 70%**

m	f	$X_i$	$X_{\text{сеп}}$	$S^2$	S	P	t(P, f)	Екстрактивні речовини, %	$\varepsilon$ , %
Трава безсмертника приквіткового									
5	4	26,7645	26,7682	0,022591148	0,15030352	0,95	2,78	26,77 ±0,21	1,56
		26,9103							
		26,5162							
		26,8355							
		26,8143							
Квітки безсмертника приквіткового									
5	4	25,0024	25,0045	0,0292764	0,171104	0,95	2,78	25,00 ±0,24	1,90
		25,1129							
		24,7721							
		24,9204							
		25,2149							

Таблиця 5.31

**Метрологічна характеристика результатів визначення екстрактивних речовин сировини безсмертника приквіткового, екстрагент: етанол 96%**

m	f	$X_i$	$X_{\text{сеп}}$	$S^2$	S	P	t(P, f)	Екстрактивні речовини, %	$\varepsilon$ , %
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Продовж. табл. 5.31

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Трава безсмертника приквіткового									
5	4	16,8731	16,8858	0,000180137	0,0134215	0,95	2,78	16,89±0,20	2,20
		16,9081							
		16,8872							
		16,8809							
		16,8798							
Квітки безсмертника приквіткового									
5	4	14,3153	14,2998	0,000162767	0,0127580	0,95	2,78	14,30±0,23	2,52
		14,2845							
		14,2904							
		14,3092							
		14,2997							

Було встановлено, що найбільше вилучення екстрактивних речовин з сировини безсмертника приквіткового здійснюється при застосуванні етанолу 70 %.

Для розробки технології виготовлення лікарських засобів з рослинної сировини важливим дослідженням є вивчення динаміки виходу діючих речовин при екстрагуванні сировини. Цей процес залежить від ряду технологічних параметрів сировини, від особливості методів проведення процесу екстракції та проміжного контролю.

Крім загальної кількості екстрактивних речовин, необхідно аналізувати екстракцію речовин, які обумовлюють фармакологічну активність лікарського засобу. Для відстеження динаміки вилучення екстрактивних речовин при екстрагуванні етанолом 70 % вивчався вміст екстрактивних речовин в окремих послідовних зливах. Результати визначення наведено в таблиці 5.32 та рисунках 5.1 і 5.2.

Таблиця 5.32

**Динаміка вилучення екстрактивних речовин етанолом 70 % у послідовних зливах**

Номер зливу	Вихід екстрактивних речовин, %	
	Трава	Квітки
1	5,32	5,01
2	4,77	4,40
3	4,38	4,24
4	4,21	4,06
5	2,98	3,12
6	2,80	2,25
7	1,76	2,10
Разом	26,22	25,18



Рис. 5.1 Динаміка вилучення екстрактивних речовин за зливами з трави безсмертника приквіткового етанолом 70 %



Рис 5.2 Динаміка вилучення екстрактивних речовин за зливами з квіток безсмертника приквіткового етанолом 70 %

Як зазначено вище, крім визначення загальної кількості екстрактивних речовин для розробки найбільш раціональної технології виготовлення лікарських засобів із рослинної сировини важливим є визначення при екстрагуванні динаміки виходу флавоноїдів, які обумовлюють фармакологічну активність лікарського засобу.

Для відстеження динаміки вилучення флавоноїдів при екстрагуванні сировини етанолом 70 % вивчали вміст флавоноїдів у окремих послідовних зливах методом спектрофотометрії (розділ 2.3).

Результати визначення суми флавоноїдів наведено в таблиці 5.33 та на рисунках 5.3 і 5.4.

Таблиця 5.33

**Динаміка вилучення суми флавоноїдів з сировини безсмертника приквіткового**

Номер зливу	Вихід суми флавоноїдів, %	
	Трава	Квітки
1	2	3

Продовж. табл. 5.33

1	2	3
1	0,55	0,43
2	0,53	0,42
3	0,51	0,38
4	0,45	0,29
5	0,31	0,19
6	0,14	0,12
7	0,09	0,06
Разом	2,58	1,89

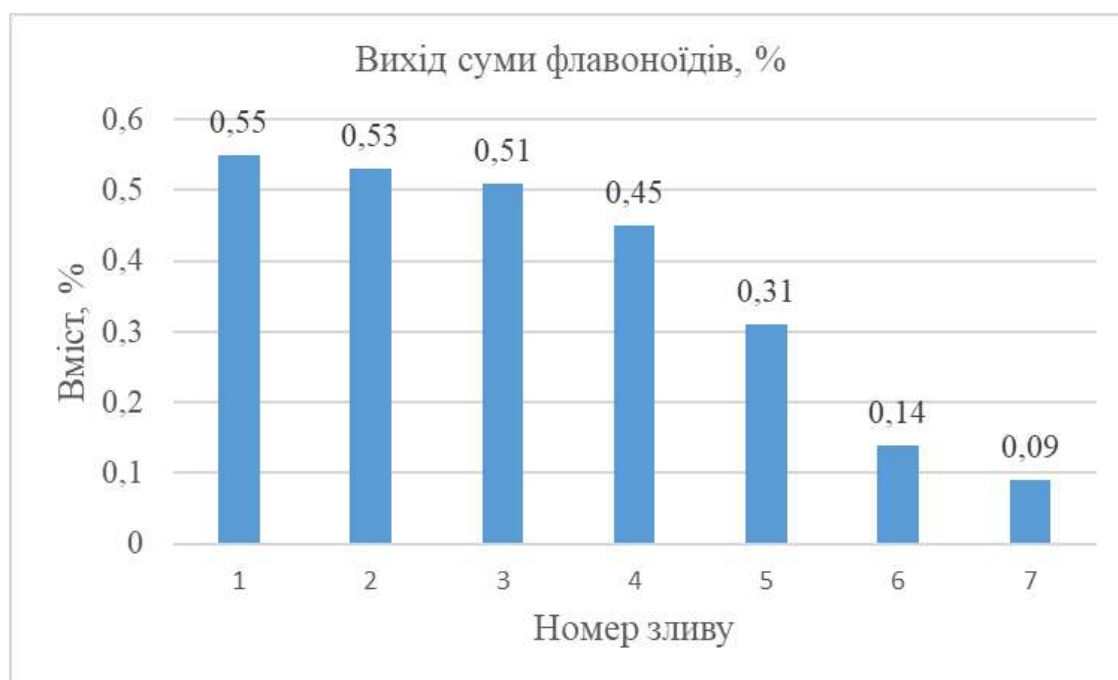


Рис. 5.3 Динаміка вилучення флавоноїдів за зливами з безсмертника приквіткового трави етанолом 70 %

Таким чином раціональним співвідношення сировина – готовий екстракт є співвідношення 1:5, так як після 5-6 зливу кількість екстрактивних речовин зменшується і продовжувати подачу екстрагенту не раціонально.

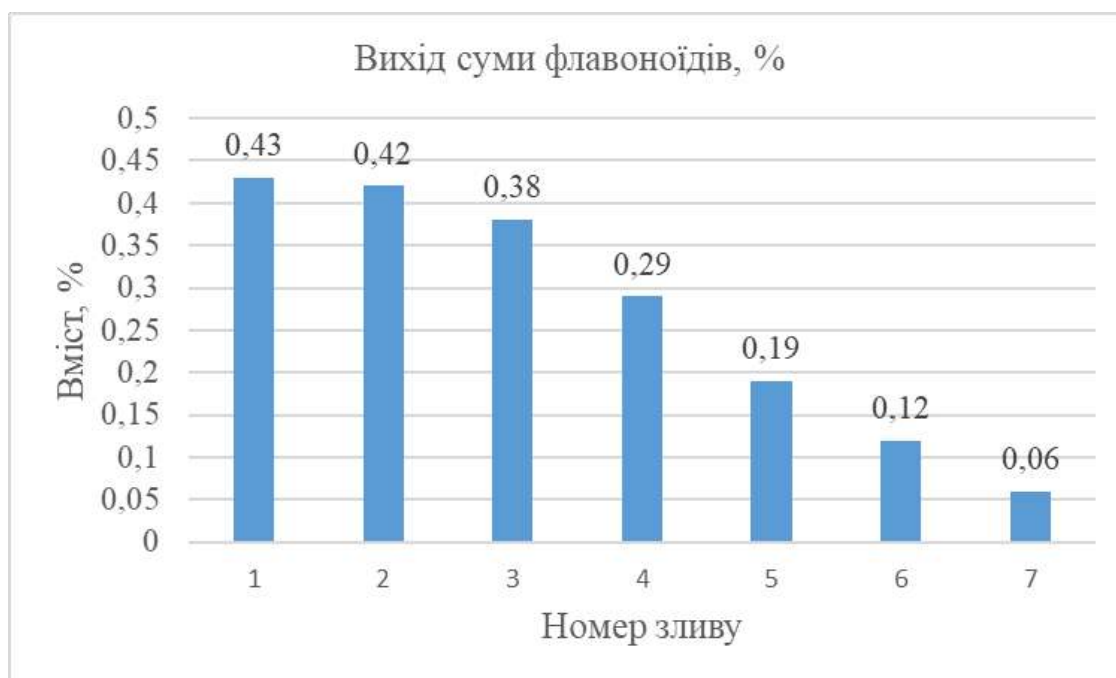


Рис. 5.4 Динаміка вилучення флавоноїдів за зливами з безсмертника приквіткового квіток етанолом 70 %

На основі дослідження динаміки вилучення екстрактивних речовин і флавоноїдів із досліджуваної сировини можна зробити висновок, що доцільно використовувати перші 5 зливи, які вилучають значну кількість екстрактивних речовин та флавоноїдів.

## 5.2 Одержання екстракту з сировини безсмертника приквіткового

Важливими показниками технологічних параметрів сировини є фактори, які впливають на екстракцію: екстрагент, співвідношення сировина-екстрагент, метод та тривалість екстракції, температурний режим.

Попередньо було визначено, що як екстрагент при екстракції сировини безсмертника приквіткового раціонально використовувати 70 % етанол.

Також було визначено, що для одержання лікарського засобу оптимальним співвідношенням сировина - готовий екстракт є співвідношення 1:5.

Для отримання рідкого екстракту безсмертника приквіткового квіток застосовували сучасний метод вакуумно-фільтраційної екстракції.

Цей метод дозволяє максимально вилучати БАР, а також він є досить комерційно привабливим: має низьку собівартість, незатратний у часі, не потребує високовартісного обладнання.

Процес одержання фармакологічних засобів повинен проводитися з дотриманням санітарних і гігієнічних норм, які направлені на попередження мікробного забруднення.

Процес виготовлення рідкого екстракту безсмертника приквіткового квіток складається з наступних стадій:

ДР 1. Підготовка виробництва

ДР 1.1 Санітарна підготовка виробництва

ДР 1.2 Підготовка персоналу

ДР 1.3 Миття і сушка флаконів і кришок

ДР 2 Підготовка сировини

ДР 2.1 Подрібнення рослинної сировини

Сировину в кількості 10,050 кг частинами зважували на вагах у тарі, потім подрібнювали на млинку.

Після подрібнення сировину просіювали крізь сито з отворами діаметром 2 мм. Частки сировини, які більші за 2 мм повертали на повторне подрібнення. При просіюванні здійснювали контроль на якість розсіювання, відсутність механічних включень. Біля 50 г були відходами просіювання, які збирали та утилізували. Таким чином, отримували 10,0 кг подрібненої рослинної сировини.

ДР 2.2 Приготування екстрагенту

На основі попередніх досліджень було з'ясовано, що як екстрагент для отримання екстракту, слід обирати 70 % етанол. Для одержання 70 % етанолу

використовували етанол 96 % і воду очищену. Для цього етанол 96 % в кількості 64,60 л та воду очищену в кількості 24,00 л ретельно змішували.

Вміст етанолу повинен бути 70 %, що відповідає густині  $0,8677\text{г/см}^3$ . З урахуванням коефіцієнта поглинання сировини для етанолу 70 %, який складає 3,86 необхідно 88,6 л екстрагенту.

ТП 3 Отримання екстракту безсмертника приквіткового квіток.

ТП 3.1 Екстрагування

Подрібнену рослинну сировину 10,0 кг завантажували у вакуумно-фільтраційний екстрактор.

На сировину подавали екстрагент до утворення «дзеркала» та залишали для настоювання і фільтрації.

Після повного проходження екстрагента в нижній резервуар підключали вакуум до остаточного виходу екстракту. Після цього знову на сировину подавали екстрагент до утворення «дзеркала» і повторювали цей етап. Після використання всього екстрагента, кількість якого було розрахована в співвідношенні сировина – отриманий екстракт 1:5, витяжку перемішували, а потім поміщали в збірник для відстоювання.

ТП 3.2 Відстоювання.

Одержану витяжку у збірнику для відстоювання перемішували 15-20 хв і залишали при температурі  $8\text{ }^{\circ}\text{C}$  на 48 год.

ТП 3.3 Фільтрування

Після відстоювання екстракт фільтрували в збірник. Отримували 50,0 л екстракту безсмертника приквіткового квіток.

ПМВ 4 Фасування, пакування та маркування.

Фасування екстракту відбувалось у чисті і сухі флакони по 100 мл. Відбиралася середня проба для проведення повного аналізу на відповідність вимогам проекту МКЯ.

ПВ 5 Регенерація екстрагента. Згідно ДФУ I, доп. 2



Сировина, проміжні продукти та матеріали	Одержання екстракту квіток безсмертника приквіткового	Контроль в процесі виробництва
Вода очищена, етанол	Стадія 1. Приготування екстрагенту. Мірник, реактор	Концентрація етанолу, час перемішування, температура, об'єм екстрагенту.
Лікарська Рослина сировина: квітки безсмертника приквіткового	Стадія 2. Приготування рослинної сировини	Кількість сировини, однорідність просіву, розмір часток.
	Стадія 3. Приготування витягу з сировини. Вакуумно-фільтраційний екстрактор	Кількість сировини та екстрагенту, швидкість подачі екстрагенту, величина і час подачі вакууму
	Стадія 4. Відстоювання	Час та температура відстоювання
	Стадія 5. Фільтрація екстракту	Величина тиску, контроль проміжної продукції
	Пакування екстракту в готову лікарську форму	
Флакони та кришки	Стадія 6. Миття та сушіння флаконів, пробок та кришок	Температура води для миття, температура сушіння, чистота флаконів і пробок
Етикетки, пачки, інструкції до застосування	Стадія 7. Фасування, маркування та пакування в пачки готової продукції Автоматична лінія фасування та пакування	Норма заповнення, комплектність, правильність печаті (номер серії, термін придатності)
Коробки, групові етикетки	Стадія 8. Пакування пачок у коробки Стіл для пакування	Кількість пачок у коробці, правильність печаті
	<b>Готова продукція</b>	Контроль готової продукції

Рис. 5.5 Технологічна схема одержання безсмертника приквіткового квіток рідкого екстракту

### 5.3 Стандартизація сировини та екстракту безсмертника приквіткового квіток

#### 5.3.1 Визначення показників якості безсмертника приквіткового трави

Для розробки проекту МКЯ на траву безсмертника приквіткового були визначені основні показники: макро- та мікроскопічні ознаки будови, втрата в масі при висушуванні, загальна зола та ідентифікація за якісними реакціями і хроматографічним аналізом.

Також було визначено вміст діючих речовин: вміст екстрактивних речовин, вміст суми флавоноїдів (спектрофотометричним методом у перерахунку на цинарозид і суху сировину).

Для верифікації показників було досліджено 5 серій трави безсмертника приквіткового.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

А. Стебло пряме, просте, злегка ребристе від 1 до 10 мм у діаметрі, довжиною від 15 до 20 см, верхня частина стебла розгалужена,. Листя чергове, вузьке, ланцетоподібне, еліптичне, зворотньо-ланцетоподібне від 1,5 до 10 см завдовжки і від 0,5 до 3 см завширшки. Стебло і листя опушені дрібними волосками сіро-зеленого кольору. Суцвіття розміром від 2 до 7 см, яскраво забарвлено, темно-червоного кольору. Суцвіття складається з центрального диска, в якому знаходяться окремі квітки, і обгортки з модифікованого листя та приквітників. Обгортка оточує декількома рядами диск і створює блиску, темно-червону оцвітину навколо диску. Квітки жовтого кольору, на зовнішньому колі диска суцвіття зосереджені одностатеві, жіночі квітки, які не мають тичинок. У центрі суцвіття в проекції потовщеної частини стебла знаходяться двостатеві квітки, які мають довший віночок і п'ять тичинок, з'єднаних у пильовиках і маточку у центрі з однією сім'ябрунькою. Запах специфічний, смак гіркій.

В. У порошку трави виявлено такі діагностичні структури: фрагменти приквітників, які представлені прозенхімними, прямостінними, інколи загостреними (веретеноподібної форми) клітинами з рівномірно потовщеними оболонками. Також зустрічаються паренхімні, багатокутні клітини, які мають дуже потовщені прямі стінки з добре помітними порами. Зустрічаються фрагменти листочка приквітника, клітини якого мають вільний край із загостреною верхівкою. Фрагменти пелюсток покриті бахромчастими та багатоклітинними дворядними залозистими волосками. Фрагменти стебла представлені багатоклітинними дворядними залозистими волосками, судинно-волокнистими пучками, присутні ділянки кутової коленхіми. Зустрічаються прості волоски з базальними короткими клітинами і однією довгою термінальною клітиною, яка може відламуватися, (при цьому залишаються чотири базальні клітини основи, стінки базальних клітин є більш потовщені); верхня епідерма представлена паренхімними, багатокутними, клітинами з прямостінними або злегка звивистими рівномірно потовщеними стінками. Клітини нижньою епідерми паренхімні та мають звивисті стінки. Продихи аномоцитного та анізоцитного типу.

С. До 1,0 г подрібненої сировини додають 50 мл води, нагрівають на киплячій водяній бані протягом 20 хв, охолоджують і фільтрують. До 3 мл одержаного розчину додають 0,2 мл 1% розчину феруму (III) хлориду Р, з'являється чорно-зелене забарвлення, що свідчить про наявність у траві безсмертника приквіткового сполук фенольної природи.

#### *Тонкошарова хроматографія*

*Випробуваний розчин:* До 2,0 г подрібненої на порошок сировини додають 20 мл етанолу (70 % об/об) та нагрівають з перемішуванням на киплячій водяній бані зі зворотним холодильником при 40 °С протягом 2 год. Відстоюють протягом 5 хв та фільтрують.

*Розчин порівняння:* 0,25 мг ФСЗ цинарозиду та 0,25 мг ФСЗ кислоти кофейної розчиняють в 5 мл етанолу (70 % об/об).

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю Р (хроматографічні пластинки «Silicagel60» F254 розміром 6x10).

*Рухома фаза:* бутанол-оцтова кислота-вода (4: 1: 2).

*Об'єм проби, що наноситься:* 0,05 мл отриманого екстракту наносять на пластинку смугами 10 мм (або 8 мм), поряд наносять 0,05 мл розчину порівняння.

*Відстань, що має пройти рухома фаза:* 10 см від лінії старту.

*Висушування:* на повітрі, потім переглядають в УФ-світлі.

*Виявлення:* на хроматограмі екстракту трави спостерігають зону жовтої флюоресценції на рівні зони, яка відповідає зоні цинарозиду розчину порівняння; безпосередньо вище неї спостерігають зону світло-блакитної флюоресценції, яка відповідає зоні кофейної кислоти розчину порівняння. Це доводить наявність у траві безсмертника приквітникового цинарозиду та кофейної кислоти. Також можуть бути присутні інші зони.

#### ВИПРОБУВАННЯ

*Втрата в масі при висушуванні.* Не більше 8,0 %.

*Визначення вмісту загальної золи.* Не більше 9,0 %.

*Домішки.* Фрагменти рослини, що почорніли, не більше 2 %. Органічних домішок (корені) – не більше 1 %, мінеральних домішок – не більше ніж 1 %.

*Визначення вмісту екстрактивних речовин.* Не менше 20,0 % у перерахунку на абсолютно суху сировину.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Визначення вмісту суми флавоноїдів, досліджують спектрофотометричним методом. Сума флавоноїдів має складати не менше 2,0 % у перерахунку на цинарозид і суху сировину.

Точну наважку трави 1.0 г, подрібненої до розміру часток 2 мм, поміщують в колбу з шліфом місткістю 150 мл, додають 25 мл *етанолу (70 %, об/об) Р*, колбу приєднують до зворотного холодильника і нагрівають на киплячій водяній бані протягом 30 хвилин. Після охолодження колби до кімнатної температури, вміст фільтрують крізь паперовий фільтр у мірну колбу місткістю 100 мл. Далі зазначеним

вище способом екстракцію повторюють ще 3 рази тим же екстрагентом. Витяжки фільтрують в ту ж мірну колбу, обсяг доводять до мітки *етанолу* (70 %, об/об) *P*.

*Приготування 5% розчину алюмінію хлориду.* 5.0 г *алюмінію хлориду P* поміщають у мірну колбу на 100 мл, додають 70 мл *етанолу* (96%, об/об) *P*, після розчинення, доводять об'єм *етанолом* (96%, об/об) *P* до мітки.

*Випробувальний розчин.* У мірну колбу місткістю 25 мл поміщають 2,5 мл екстракту, додають 5 мл 5% розчину *алюмінію хлориду в 96% етанолі P* і 2 краплі *розведеної кислоти оцтової P*. Обсяг розчину доводять *етанолом* (70%, об/об) *P* до позначки і залишають на 45 хв. Оптичну густину (2.2.25) отриманого розчину вимірюють на спектрофотометрі за довжини хвилі 400 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм.

*Розчин порівняння.* В мірній колбі місткістю 25 мл до 2,5 мл витяжки додають 2 краплі *розведеної кислоти оцтової P*, і доводять *етанолом* (70%, об/об) *P* до позначки.

Для перерахунку вмісту суми флавоноїдів на *цінарозид* використовують питомий показник поглинання комплексу розчину *ФСЗ цінарозиду* з *алюмінію хлоридом* за довжини хвилі 400 нм становить  $E_{1\text{см}}^{1\%} = 145,0 \pm 2,3$ . Розрахунок отриманих результатів здійснюють за формулою:

$$X = \frac{A_x \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100}{E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot m \cdot V_a \cdot (100 - W)},$$

де  $A_x$  – оптична густина дослідженого розчину;

$V_1$  та  $V_2$  – розведення досліджуваних розчинів, мл;

$E_{1\text{см}}^{1\%}$  – питомий показник поглинання стандартного розчину *цінарозиду*, який дорівнює 145, за довжини хвилі 400 нм;

$m$  – наважка досліджуваної сировини, г;

$W$  – втрата в масі при висушуванні сировини;

$V_a$  – об'єм аліквоти, мл.

### 5.3.2 Визначення показників якості безсмертника приквіткового квіток

Для підготовки проекту методів контролю якості для квіток безсмертника приквіткового визначають основні показники. Досліджують макро- та мікроскопічні ознаки будови сировини, втрату в масі при висушуванні, загальну золу та проводять ідентифікацію за якісними реакціями і хроматографічним аналізом. Також було визначають вміст діючих речовин: екстрактивні речовини, суму флавоноїдів (методом спектрофотометрії в перерахунку на цинарозид і суху сировину).

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ .

А. Суцвіття розміром від 2 до 7 см, яскраво забарвлені, темно-червоного кольору. Суцвіття складається з центрального диска, в якому знаходяться окремі квітки, і обгортки з модифікованого листа та приквітників. Обгортка оточує декількома рядами диск і створює блиску, темно-червону оцвітину навколо диску. Квітки жовтого кольору, на зовнішньому колі диска суцвіття зосереджені одностатеві, жіночі квітки, які не мають тичинок. У центрі суцвіття в проекції потовщеної частини стебла знаходяться двостатеві квітки, які мають довший віночок і п'ять тичинок, з'єднаних у пиляках і маточку у центрі з однією сім'ябрунькою. Запах специфічний, смак гіркий. Зустрічаються залишки квітконосів довжиною до 3 см, від 1 до 2 мм у діаметрі, які опушені дрібними волосками та мають сіро-зелений колір.

В. У порошку квіток виявляють такі діагностичні структури: фрагменти приквітників представлені прозенхімними, прямостінними, інколи загостреними (веретеноподібною форми) клітинами, які мають тонку первинну і товсту вторинну клітинну стінку. Ці клітини характерні тільки для приквітників і не зустрічаються в будові інших частин рослини. Також зустрічаються багатокутні клітини, які мають дуже потовщені прямі стінки з добре помітними порами. Продихи тетрацитного типу різних розмірів, зустрічаються фрагменти багатоклітинних, дворядних залозистих волосків і клітини, які мають вільний край із загостреною верхівкою. Фрагменти пелюстки складаються з паренхімних, прямокутних клітин, зустрічаються уламки епідерми з бахромчастими та дворядними залозистими волосками. Пилок округлий,

шипуватий, трьохпоровий. Фрагменти волосків летючки складаються з прозенхімних, прямостінних клітин, у яких один край вільний, загострений і утворює шипоподібні вирости.

С. До 1,0 г подрібненої сировини додають 50 мл води очищеної, нагрівають на киплячій водяній бані протягом 20 хв, охолоджують і фільтрують. До 3 мл одержаного розчину додають 0,2 мл 1% розчину феруму (III) хлориду Р, з'являється чорно-зелене забарвлення, що свідчить про наявність у безсмертника приквіткового квітках сполук фенольної природи.

*Тонкошарова хроматографія.*

*Випробуваний розчин:* До 2,0 г подрібненої на порошок сировини додають 20 мл етанолу (70 % об/об) Р та нагрівають з перемішуванням на киплячій водяній бані зі зворотним холодильником при 40 °С протягом 2 год. Відстоюють протягом 5 хв та фільтрують.

*Розчин порівняння:* 0,25 мг ФСЗ цинарозиду та 0,25 мг ФСЗ кислоти кофейної розчиняли в 5 мл етанолу (70 % об/об) Р.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю (хроматографічні пластинки «Silicagel60» F254 розміром 6x10).

*Рухома фаза:* бутанол-оцтова кислота-вода (4: 1: 2).

*Об'єм проби, що наноситься:* 0,05 мл отриманого екстракту наносять на пластинку смугами 10 мм (або 8 мм), поряд наносять 0,05 мл розчину порівняння.

*Відстань, що має пройти рухома фаза:* 10 см від лінії старту.

*Висушування:* на повітрі, потім переглядають в УФ-світлі.

*Виявлення:* на хроматограмі екстракту квіток, спостерігають зону жовтої флюоресценції на рівні зони, яка відповідає зоні цинарозиду розчину порівняння; безпосередньо вище неї спостерігають зону світло-блакитної флюоресценції, яка відповідає зоні кофейної кислоти розчину порівняння. Це доводить наявність у квітках безсмертника приквіткового цинарозиду та кофейної кислоти. Також можуть бути присутні також інші зони.

## ВИПРОБУВАННЯ

*Втрата в масі при висушуванні.* Не більше 7,0 %.

*Визначення вмісту загальної золи.* Не більше 5,0 %.

*Домішки.* Фрагменти квіток, що почорніли, не більше 2 %. Органічних домішок (фрагменти листя і стебла) не більше 1 %, мінеральних домішок – не більш ніж 1 %.

*Визначення вмісту екстрактивних речовин.* Не менш 19,00 % у перерахунку на абсолютно суху сировину.

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ .

Визначення вмісту суми флавоноїдів, проводять спектрофотометричним методом. Сума флавоноїдів має складати не менше 1,5 % у перерахунку на цинарозид і суху сировину.

Точну наважку квіток 1.0 г, подрібненої до розміру часток 2 мм, поміщають у колбу зі шліфом місткістю 150 мл, додають 25 мл *етанолу (70 %, об/об) Р*, колбу приєднують до зворотного холодильника і нагрівають на киплячій водяній бані протягом 30 хв. Після охолодження колби до кімнатної температури, вміст фільтрують крізь паперовий фільтр у мірну колбу місткістю 100 мл. Далі зазначеним вище способом екстракцію повторюють ще 3 рази тим же екстрагентом. Витяжки фільтрують в ту ж мірну колбу, обсяг доводять до мітки *етанолу (70 %, об/об) Р*.

*Приготування 5 % розчину алюмінію хлориду.* 5.0 г *алюмінію хлориду Р* поміщають у мірну колбу на 100 мл, додають 70 мл *етанолу (96 %, об/об) Р*, після розчинення, доводять об'єм *етанолом (96 %, об/об) Р* до мітки.

*Випробувальний розчин.* У мірну колбу місткістю 25 мл поміщають 2,5 мл екстракту, додають 5 мл 5 % *розчину алюмінію хлориду в 96 % етанолі Р* і 2 краплі *розведеної кислоти оцтової Р*. Обсяг розчину доводять *етанолом (70 %, об/об) Р* до позначки і залишають на 45 хв. Оптичну густина (2.2.25) отриманого розчину вимірюють на спектрофотометрі за довжини хвилі 400 нм у кюветі з товщиною шару 10 мм.

*Розчин порівняння.* В мірній колбі місткістю 25 мл до 2,5 мл витяжки додають 2 краплі *розведеної кислоти оцтової Р*, і доводять *етанолом (70%, об/об) Р* до позначки. Для перерахунку вмісту суми флавоноїдів на цинарозид використовують питомий



показник поглинання комплексу розчину *ФСЗ цинарозиду* з алюмінію хлоридом за довжини хвилі 400 нм становить  $E_{1\text{см}}^{1\%} - 145,0 \pm 2,3$ . Розрахунок отриманих результатів здійснюють за формулою:

$$X = \frac{A_x \cdot V_1 \cdot V_2 \cdot 100}{E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot m \cdot V_a \cdot (100 - W)}$$

де  $A_x$  – оптична густина дослідженого розчину;

$V_1$  та  $V_2$  – розведення досліджуваних розчинів, мл;

$E_{1\text{см}}^{1\%}$  – питомий показник поглинання стандартного розчину цинарозиду, який дорівнює 145, за довжини хвилі 400 нм;

$m$  – наважка досліджуваної сировини, г;

$W$  – втрата в масі при висушуванні сировини;

$V_a$  – об'єм аліквоти, мл.

### 5.3.3 Визначення показників якості безсмертника приквіткового квіток рідкого екстракту

Для розробки методики контролю якості екстракту квіток безсмертника приквітового було визначено ряд показників якості 5 серій екстракту з квіток безсмертника приквітового, напрацьованих у лабораторних умовах.

#### ВЛАСТИВОСТІ

*Опис.* Прозора рідина жовтувато – бурого кольору, запах – специфічний, смак – гіркуватий.

#### ІДЕНТИФІКАЦІЯ

*Тонкошарова хроматографія.*

*Розчин порівняння:* 0,25 мг *ФСЗ цинарозиду* та 0,25 мг *ФСЗ кислоти кофейної* розчиняють в 5 мл *етанолу (70 % об/об)*.

*Пластинка:* ТШХ пластинка із шаром силікагелю (хроматографічні пластинки «Silicagel60» F254 розміром 6x10).

*Рухома фаза:* бутанол-оцтова кислота-вода (4: 1: 2).

*Об'єм проби, що наноситься:* 0,05 мл екстракту з квіток наносять на пластинку смугами 10 мм (або 8 мм), поряд наносять 0,05 мл розчину порівняння.

*Відстань, що має пройти рухома фаза:* 10 см від лінії старту.

*Висушування:* на повітрі, потім переглядають в УФ-світлі.

*Виявлення:* на хроматограмі екстракту квіток, спостерігають зону жовтої флюоресценції на рівні зони, яка відповідає зоні цинарозиду розчину порівняння; безпосередньо вище неї спостерігають зону світло-блакитної флюоресценції, яка відповідає зоні кофейної кислоти розчину порівняння.

## ВИПРОБУВАННЯ

*Сухий залишок.* 5,00 мл екстракту поміщають в плоскодонну чашку діаметром близько 50 мм і заввишки близько 30 мм. Випаровують насухо на киплячій водній бані і висушують до постійної маси. Сухий залишок екстракту з квіток безсмертника приквіткового має бути не менше 18 %.

*Важкі метали.* До 10,00 мл екстракту додають 1мл *кислоти сульфатної Р*, обережно спалюють у тиглі і прожарюють на піщаному нагрівнику. До одержаного залишку додають при нагріванні 5 мл розчину 615 г/л *амонію ацетату Р*, фільтрують крізь беззольний фільтр, промивають 5 мл *води очищеної Р* і доводять об'єм фільтрату водою Р до 100 мл. До 12 мл одержаного розчину додають 2 мл *буферного розчину рН 3,5* і перемішують. До 1,2 мл реактиву *тіоацетаміду Р* додають отриману суміш і негайно перемішують. Також за тих самих умов готують еталон, використовуючи замість 12 мл випробуваного розчину суміш 10 мл *еталонного розчину плюмбуму (1ppm або 2ppm Pb)* і 2 мл випробуваного розчину. Готують контрольний розчин, використовуючи суміш 10 мл *води Р* і 2 мл випробуваного розчину. У порівнянні з контрольним розчином еталон мав світло-коричневе забарвлення. Через 2 хв коричневе забарвлення розчину, що випробувався, не було інтенсивнішим за забарвлення еталону. Вміст важких металів – не більше 0,001 %.

*Етанол.* Визначення вмісту етанолу проводять методом перегонки з подальшим визначенням густини відгону. За алкоголіметричними таблицями знаходять вміст етанолу у відсотках за об'ємом. Вміст етанолу в препараті має бути не менше 65,0 %.

#### КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ

Визначення суми флавоноїдів проводять спектрофотометричним методом. Сума флавоноїдів має бути не менше 1,5 % у перерахунку на цинарозид.

*Приготування 5 % розчину алюмінію хлориду.* 5.0 г алюмінію хлориду *P* поміщають у мірну колбу на 100 мл, додають 70 мл етанолу (96 %, об/об) *P*, після розчинення, доводять об'єм етанолом (96 %, об/об) *P* до мітки.

*Випробувальний розчин.* У мірну колбу місткістю 25 мл поміщають 2,5 мл екстракту, додають 5 мл 5 % розчину алюмінію хлориду в 96 % етанолі *P* і 2 краплі розведеної кислоти оцтової *P*. Обсяг розчину доводять етанолом (70 %, об/об) *P* до позначки і залишають на 45 хв. Оптичну густину (2.2.25) отриманого розчину вимірюють на спектрофотометрі за довжини хвилі 400 нм в кюветі з товщиною шару 10 мм.

*Розчин порівняння.* В мірній колбі місткістю 25 мл до 2,5 мл витяжки додають 2 краплі розведеної кислоти оцтової *P* і доводять етанолом (70 %, об/об) *P* до позначки. Для перерахунку вмісту суми флавоноїдів на цинарозид був використаний питомий показник поглинання комплексу розчину ФСЗ цинарозиду з алюмінію хлоридом за довжини хвилі 400 нм становить  $E_{1\text{см}}^{1\%} = 145,0 \pm 2,3$ . Розрахунок отриманих результатів здійснюють за формулою:

$$X = \frac{A_x \cdot V_1 \cdot V_2}{E_{1\text{см}}^{1\%} \cdot V_a},$$

де  $A_x$  – оптична густина дослідженого розчину;

$V_1$  та  $V_2$  – розведення досліджуваних розчинів, мл;

$E_{1\text{см}}^{1\%}$  – питомий показник поглинання стандартного розчину цинарозиду, який дорівнює 145, за довжини хвилі 400 нм;

$V_a$  – об'єм аліквоти, мл.

### *Об'єм вмісту пакування*

Випробування проводять з 10 банок за допомогою мірного циліндру місткістю 100 мл. Об'єм вмісту пакування має бути від 97 мл до 103 мл.

### 5.4 Вивчення антимікробної та протигрибкової дії безсмертника приквіткового трави та квіток рідких екстрактів

Для вивчення антибактеріальних властивостей екстрактів безсмертника приквіткового виготовляли екстракти з трави і квіток безсмертника в співвідношенні: сировина – готовий екстракт 1:5. Як екстрагент використовували етанол різної концентрації та воду, при цьому співвідношення сировина – готовий екстракт було постійним 1: 5. Для виключення упередженості дослідження проводили «сліпим» методом, тому кожен досліджуваний зразок мав свій номер. У таблиці 5.34 наведено присвоєний номер досліджуваного зразка та відповідний вид сировини і екстрагента.

*Таблиця 5.34*

#### **Номер досліджуваного зразка та відповідний вид сировини і екстрагента**

Номер зразка	Екстрагент	Вид сировини
1	Етанол 70 %	Трава
2	Етанол 70 %	Квітки
3	Етанол 96 %	Трава
4	Етанол 40 %	Квітки
5	Етанол 40 %	Трава
6	Вода	Квітки
7	Вода	Трава

Визначення чутливості штамів мікроорганізмів до досліджуваних зразків екстрактів проводили у відповідності до методичних вказівок «Визначення чутливості мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів» (Наказ Міністерства

охорони здоров'я України від 05.04.2007 р. № 167) методом колодязів на середовищі Мюллера-Хинтона («HiMedia Laboratories» Pvt. Ltd India). Середовища для культивування застосовували відповідно до виду мікроорганізмів згідно з існуючими методичними розробками і рекомендаціями та готували відповідно до інструкції виробника. Чутливість грибів визначали на середовищі «Сабуро-декстрозний агар».

У процесі дослідження встановлено антибактеріальну активність екстрактів безсмертника приквіткового щодо практично всіх тест-культур, а також до ряду клінічних штамів. Оцінку антибактеріальної активності дослідних зразків проводили за діаметром зон затримки росту, що є найбільш показовим та об'єктивним показником:

- 10 мм - мікроорганізм не чутливий до дослідної речовини;
- 10-15 мм – мікроорганізм слабочутливий до дослідної речовини;
- 15-25 мм - мікроорганізм чутливий до дослідної речовини;
- 25 мм та вище - мікроорганізм високочутливий до дослідної речовини.

Результати активності екстрактів по відношенню до еталонних тест-культур представлено у таблиці 5.31.

Антибактеріальна ефективність екстрактів по відношенню до клінічних штамів представлена у таблиці 5.35.

Таблиця 5.35

**Антибактеріальна активність екстрактів безсмертника приквіткового по відношенню до еталонних тест-культур**

Зразки	Діаметри зон затримки росту, мм; n = 3, P = 0.95					
	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>Basillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Candida albicans</i> ATCC 653/885
1	2	3	4	5	6	7

Продовж. табл. 3.35

1	2	3	4	5	6	7
1	22,3±0,8	18,7±0,8	15,2±0,1	15,2±0,1	21,0±1,4	19,3±0,8
2	25,4±0,8	18,7±0,8	16,3±0,8	17,2±0,2	24,7±1,6	19,3±0,8
3	20,7±0,8	17,3±0,8	15,2±0,1	15,3±0,8	20,3±0,8	18,1±0,2
4	21,4±0,8	17,3±0,8	15,7±0,8	15,7±0,8	21,7±0,8	17,2±0,2
5	20,7±0,8	19,0±1,4	16,2±0,2	16,7±0,8	21,3±0,8	18,0±1,4
6	20,3±0,8	17,2±0,2	16,0±1,3	16,3±0,8	20,1±0,2	17,7±0,8
7	19,4±0,8	17,3±0,8	15,7±0,8	15,7±0,8	19,7±0,8	17,7±0,8

Таблиця 5.36

**Антибактеріальна активність екстрактів безсмертника приквіткового по відношенню до клінічних штамів**

Зразки	Діаметри зон затримки росту, мм; n = 3, P = 0.95					
	<i>Staphylococcus aureus</i> № 33	<i>Staphylococcus aureus</i> № 45	<i>Staphylococcus aureus</i> № 79	<i>Escherichia coli</i> № 77	<i>Escherichia coli</i> № 110	<i>Klebsiella pneumoniae</i> № 102
1	17,7±0,8	18,0±1,4	19,2±0,1	16,7±0,8	16,7±0,8	16,7±0,8
2	19,7±0,8	20,2±0,1	20,7±0,8	18,1±0,1	18,3±0,8	17,3±0,8
3	16,3±0,8	17,2±0,1	16,7±0,8	15,7±0,8	14,7±0,8	зростання
4	17,7±0,8	17,3±0,8	17,0±1,4	16,7±0,8	16,7±0,8	15,1±0,2
5	16,2±0,2	16,7±0,8	17,1±0,2	16,7±0,8	16,0±1,4	зростання
6	17,1±0,1	16,7±0,8	16,7±0,8	15,7±0,8	16,2±0,3	зростання
7	16,7±0,8	16,7±0,8	17,1±0,1	15,7±0,8	16,7±0,8	зростання



Таблиця 5.38

**Мінімальна бактеріцидна концентрація зразків екстрактів безсмертника приквіткового**

Мікроорганізми	МБЦК мкг/мл						
	Зразки						
	1	2	3	4	5	6	7
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	500	250	500	250	250	250	250
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	500	250	500	500	500	500	500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	500	500	1000	1000	1000	1000	1000
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC6633	250	250	500	250	250	500	500
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 4636	500	500	1000	1000	1000	1000	1000
<i>Candida albicans</i> ATCC 885-653	1000	500	1000	1000	500	1000	1000

Було встановлено, що усі досліджувані зразки екстрактів трави і квіток безсмертника приквіткового мають антибактеріальну активність відносно еталонних тест-культур мікроорганізмів (діаметр зони затримки росту – від 15,2 до 25,4 мм) та протигрибкову активність по відношенню до референтного штаму *Candida albicans* (діаметр зони затримки росту – від 17,2 до 19,3 мм). Але по відношенню до клінічних штамів антибактеріальна активність більш виражена в етанольних екстрактах трави і квіток відносно *Staphylococcus aureus* (діаметр зони затримки росту 20,7 мм для етанольного 70 % екстракту квіток), *Escherichia coli* (діаметр зони затримки росту 18,3 мм для етанольного 70 % екстракту квіток), *Klebsiella pneumoniae* (діаметр зони затримки росту 17,3 мм для етанольного 70 % екстракту квіток), *Candida albicans* (діаметр зони затримки росту 16,7 мм для етанольного 70 % екстракту трави), *Aspergillus niger* (діаметр зони затримки росту 15,7 мм для етанольного 70 % екстракту квіток). Відносно клінічних штамів *Pseudomonas aeruginosa* антимикробну



активність мають тільки екстракти квіток і трави безсмертника приквіткового етанольні 70 % (діаметр зони затримки росту 16,2 мм для екстракту трави і 15,7 мм для екстракту квіток). При цьому антимікробна дія етанольного 70 % екстракту квіток більш виражена [47,34]. Дослідження проводили в ДУ «Інститут мікробіології та імунології ім. І.І. Мечникова НАМНУ» під керівництвом к. біол. н., ст.н.сп. Т. П. Осолодченко.

### 5.5 Антиоксидантні властивості екстракту безсмертника приквіткового трави

При дослідженні антиоксидантної активності екстракту трави безсмертника приквіткового використовували модифікацію хемілюмінесцентного методу (ХМ), в якому як активатор використовувався люмінол. Цей метод дозволив визначити загальну кількість вільних радикалів, які зв'язує екстракт трави безсмертника приквіткового в досліджуваному зразку, і, таким чином проаналізувати загальну антиоксидантну ємність.

У результаті дослідження антиоксидантної властивості експериментально встановлено що, екстракт трави безсмертника приквіткового завдяки вмісту флавоноїдів в ХЛ - системі:  $H_2L_2 - H_2O_2 - H\nu$  призводить до зменшення максимальної інтенсивності світіння. При цьому оптимальним для визначення ефекту інгібування є порядок змішування компонентів хемілюмінесцентної композиції, коли останнім додається  $H\nu$ . Спостерігалось, що зменшення інтенсивності ХЛ було пропорційне концентрації інгібіторів. Встановлено, що за характеристикою антиоксидантної властивості була обрана величина розбавлення, при якій досягається зниження ХЛ на 50 %. Експериментально встановлено, що  $I/I_0$  на 50 % досягається при розбавленні екстракту 7,5:1000, що свідчить про високу антиоксидантну властивість екстракту [65]. Необхідно також враховувати, що визначення антиоксидантів, як хімічних сполук не є коректним і не дасть повного уявлення про антиоксидантну активність досліджуваного екстракту, тому що ця активність обумовлена не тільки

кількістю кожної речовини з антиоксидантною активністю, а й активністю кожної з них.

### Висновки до розділу 5

1. Вперше вивчені технологічні параметри сировини безсмертника приквіткового, зокрема трави та квіток. Були визначені такі показники сировини: втрата в масі при висушуванні; питома маси; насипна маса до і після усадки; об'ємна густина; коефіцієнт водопоглинання; коефіцієнт поглинання етанолу 70 %; пористість; нарізність шару; вільний об'єм шару; загальна зола.

2. Вперше проведено дослідження на закономірність вилучення екстрактивних речовин та фенольних сполук з сировини безсмертника приквіткового в залежності від використання різних екстрагентів. Було встановлено, що найбільш оптимальним екстрагентом є етанол 70 %.

3. Вперше запропоновано одержання екстракту з квіток безсмертника приквіткового вакуумно-фільтраційним методом з використанням етанолу 70 % як екстрагента. Завдяки цій технології вилучається максимальна кількість екстрактивних речовин. Метод є найбільш раціональним з точки зору собівартості та подальшої комерційної привабливості екстракту. Також вперше вивчена динаміка вилучення екстрактивних речовин у процесі отримання екстракту та визначено оптимальне співвідношення сировина – екстракт 1:5.

4. Вперше досліджено антимікробну та протигрибкову дію екстрактів трави і квіток безсмертника приквіткового. Було встановлено, що усі досліджувані зразки екстрактів безсмертника приквіткового мають антибактеріальну активність відносно еталонних тест-культур мікроорганізмів. Але по відношенню до клінічних штамів антибактеріальна активність більш виражена у етанольних екстрактах трави і квіток до: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoni*, *Enterobacter cloacea*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*. Відносно клінічних штамів *Pseudomonas aeruginosa* антимікробну активність мають тільки етанольні 70 % екстракти квіток і

трави. При цьому антимікробна дія етанольного 70 % екстракту квіток безсмертника приквіткового більш виражена.

5. Вперше досліджено антиоксидантну активність екстракту безсмертника приквіткового хемілюмінесцентним методом (ХМ). У результаті дослідження експериментально встановлено що, екстракт трави безсмертника приквіткового в ХЛ - системі:  $H_2L_2$  -  $H_2O_2$  -  $H\nu$  призводить до зменшення максимальної інтенсивності світіння, що свідчить про високу антиоксидантну властивість екстракту.

*Результати експериментальних досліджень даного розділу наведено в таких публікаціях:*

1. 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, узагальненні результатів та підготовці статті).

2. 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 в патентному пошуку, одержанні лікарського засобу та оформленні патенту).

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено узагальнення та результати експериментального вирішення наукового завдання, яке полягає в комплексному фармакогностичному дослідженні сировини, зокрема трави та квіток безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*), розробці найбільш раціональної технології отримання лікарського засобу у вигляді рідкого екстракту безсмертника приквіткового, параметрів стандартизації сировини і готової лікарської форми та створенню проєктів МКЯ.

1. У результаті аналізу джерел літератури встановлено, що в них є інформація про безсмертник приквітковий садівничого та агрономічного характеру. Також в літературі представлена інформація несистемного вивчення тільки фенольних сполук з точки зору створення барвників для тканин зі сировини безсмертника приквіткового. З урахуванням незатратної культивуацією цієї рослини є дуже важливою необхідністю комплексного фармакогностичного дослідження безсмертника приквіткового, як перспективної лікарської рослини.

2. У траві безсмертника приквіткового виявлено фенольні сполуки: флаволи – лютеолін, ізо-орієєнтин, цинарозид, апігенін; флавоноли – кверцетин, кемпферол; аурони – брактеїн, цернуозид, ауреузидин. Вперше для вивчення та визначення вмісту окремих флавоноїдів проведено дослідження методом ВЕРХ. У результаті в траві було ідентифіковано та визначено вміст трьох флавоноїдів: кверцетин-3-О-β-D-глюкозиду, кверцетину, лютеоліну. У квітках було ідентифіковано та визначено вміст двох флавоноїдів: кверцетину та лютеоліну. При цьому вміст кверцетину у квітках, складає 14358,87 мкг/г, у меншій кількості міститься лютеолін 2091,03 мкг/г. У траві також у більшій кількості знаходиться кверцетин 7523,81 мкг/г, лютеолін 6882,89 мкг/г, у меншій – кверцетин-3-О-β-D-глюкозид (494,16 мкг/г). При визначенні суми флавоноїдів було встановлено що, сума флавоноїдів у трави складає  $2,18 \pm 0,02$  %, у квітках –  $1,61 \pm 0,01$  % у перерахунку на цинарозид і суху сировину.

3. Методом ГХ/МС встановлено якісний склад і вміст кислот жирних у траві та квітках безсмертника приквіткового. У квітках було ідентифіковано: лауринову, пальмітинову, лінолеву,  $\alpha$ -ліноленову, стеаринову, арахінову, бегенову, лігноцеринову кислоти. У траві виявлені: лауринову, лауроолеїнову, пальмітинову, капронову, лінолеву,  $\alpha$ -ліноленову, стеаринову, арахінову, бегенову, лігноцеринову, церотинову кислоти. Серед визначених жирних кислот у квітках безсмертника знаходяться в значних кількостях жирні кислоти: з ненасичених – лінолева (4,10 мг/г) і  $\alpha$ -ліноленова (2,07 мг/г), з насичених жирних кислот – пальмітинова (3,32 мг/г). У траві безсмертника серед ідентифікованих жирних кислот у великих кількостях також представлені ці кислоти, але в інших кількостях: пальмітинова (3,61 мг/г), з ненасичених - лінолева (2,85 мг/г) і  $\alpha$  - ліноленова (2,23 мг/г). Інші визначені жирні кислоти зустрічаються значно в меншій кількості. Методом ВЕРХ було визначено якісний склад та вміст органічних кислот у сировині безсмертника. У траві і квітках безсмертника приквіткового ідентифіковано 6 органічних кислот: винна, пірвіноградна, ізолимонна, лимонна, бурштинова, яблучна кислоти. У великій кількості в квітках знаходиться ізолимонна кислота (22979,68 мкг/г її частка складає 60,87 % від загальної суми ідентифікованих органічних кислот), бурштинова (7847,18 мкг/г частка 20,79 %) та лимонна кислоти (2643,01 мкг/г з часткою 7,00 %). У траві домінуючими органічними кислотами є ізолимонна (67613,38 мкг/г частка, якої від загальної суми органічних кислот складає 59,65 %), яблучна (24917,49 мкг/г з часткою 21,98 %) і бурштинова кислоти (11515,72 мкг/г частка, якої складає 10,16 %). Решта органічних кислот представлена в значно менших кількостях: у квітках – 4284,04 мкг/г з часткою 11,35 %, у траві – 9295,70 мкг/г з часткою 8,20 %.

4. Дослідження складу вуглеводів проводили методом ГХ/МС, у результаті було виявлено в квітках 12 зв'язаних та 13 вільних вуглеводів; у траві – 10 зв'язаних та 12 вільних вуглеводів. Серед визначених моноцукрів у квітках безсмертника 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 серед ідентифікованих вільних цукрів у значних

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 значно в меншій кількості. Методом ВЕРХ вперше проведено дослідження амінокислотного складу сировини безсмертника приквіткового. У квітках і траві було ідентифіковано 16 амінокислот: 7 незамінних (треонін, валін, метіонін, лейцин, ізолейцин, фенілаланін, лізин), 6 замінних (аспарагінова кислота, аланін, гліцин, глютамінова кислота, пролін, серин) та 3 частково замінних (аргінін, гістидин, тирозин). Серед незамінних амінокислот у квітках безсмертника найбільшу кількість має лейцин (201,9 мг/100 г, або частку 26,96 %) серед ідентифікованих амінокислот, серед замінних амінокислот у квітках домінують глютамінова і аспарагінова кислоти (407,2 мг/100 г, або частка 22,23 %) і (341,2 мг/100 г, або частка 18,63 % відповідно). У траві серед незамінних амінокислот найбільшу кількість мають лейцин (351,2 мг/100 г, або 27,69 %) і фенілаланін (229,5 мг/100 г, або 18,10 %). Серед замінних амінокислот - глютамінова і аспарагінова кислоти (606,1 мг/100 г, або 24,48 %) і (481,8 мг/100 г, або 19,46 % відповідно).

5. Вперше у сировині безсмертника приквіткового ідентифіковано фенолкарбонові кислоти методами ПХ, ТШХ та ВЕРХ. У результаті аналізу в досліджуваній сировині встановлено наявність 8 фенолкарбонових кислот: галова, гідроксифенілоцтова, кофейна, кумарова, ферулова, синапова, корична та хінна кислоти. При цьому у домінуючій кількості в квітках знаходиться хінна кислота (4981,55 мкг/г та має частку 33,11 % серед ідентифікованих фенолкарбонових кислот), синапова (4500,11 мкг/г частка 29,91 %) і кумарова кислоти (3092,03 мкг/г частка 20,55 %). У траві серед фенолкарбонових кислот основною є хінна кислота (44257,10 мкг/г частка серед фенолкарбонових кислот 85,23 %). Інші ідентифіковані фенолкарбонові кислоти містяться в значно менших кількостях.

6. Методом ГХ/МС було визначено якісний склад компонентів летких сполук трави та квіток безсмертника приквіткового. У результаті проведеного дослідження в траві безсмертника було ідентифіковано 26 летких сполук, у квітках – 39. В результаті визначення частки кожної з ідентифікованої речовини встановлено, що домінуючими

леткими сполуками в траві безсмертника приквіткового є: н-гексадеканова кислота 44,48 %, фітол 13,71 %, 9,12-октадеканова кислота 11,21 % і декаметілтетрасілоксан 8,55 %, у квітках – н-гексадеканова кислота 48,83 %, 9,12-октадеканова кислота 19,52 %, метиловий естер 7,10,13-гексадекатрієнової кислоти 8,85 % і тетрадеканова кислота 6,10 %.

7. За допомогою метода атомно-емісійної спектроскопії вперше досліджено мінеральний склад трави, квіток та коренів безсмертника приквіткового. У результаті дослідження було з'ясовано, що сировина має високий вміст важливих мікронутриєнтів (мг/100г): 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.

8. Вивчені морфолого-анатомічні особливості будови суцвіття, квітки, квітконосу, стебла, листя та коренів безсмертника приквіткового. Визначено основні діагностичні ознаки морфологічної та анатомічної будови, які використано для ідентифікації та розробки методів стандартизації сировини. Розроблено раціональну технологію одержання рідкого екстракту з квіток безсмертника приквіткового методом вакуумно-фільтраційної екстракції, визначено вміст екстрактивних речовин і флавоноїдів.

9. Вперше було досліджено антиоксидантну активність екстракту безсмертника приквіткового хемілюмінесцентним методом (ХМ), в якому в якості активатора використовувався люмінол. У результаті дослідження експериментально встановлено, що екстракт безсмертника приквіткового в ХЛ – системі:  $H_2L_2 - H_2O_2 - H\nu$  приводе до зменшення максимальної інтенсивності світіння. Встановлено, що за характеристикою антиоксидантної властивості була обрана величина розбавлення, при якій досягається зниження ХЛ на 50%. Експериментально встановлено, що  $I/I_0$  на 50% досягається при розбавленні екстракту 7,5:1000, що свідчить про високу антиоксидантну властивість екстракту. Вперше було досліджено антимікробні властивості та протигрибкову дію екстрактів трави та квіток безсмертника

приквіткового. Антимікробна дія досліджувалась, як на стандартні культури та і на клінічні штами мікроорганізмів. Було встановлено, що всі досліджувані зразки екстрактів трави і квіток безсмертника приквіткового мають антибактеріальну активність відносно еталонних тест-культур мікроорганізмів та протигрибкову активність по відношенню до референтного штаму *Candida albicans*. Але по відношенню до клінічних штамів антибактеріальна активність більш виражена в спиртових екстрактах трави і квіток відносно *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*. Відносно клінічних штамів *Pseudomonas aeruginosa* антимікробну активність мають тільки етанольні 70% екстракти квіток і трави. При цьому в цілому антимікробна дія етанольного екстракту квіток більш виражена.

Вивчені технологічні параметри сировини та створені проекти МКЯ на «Безсмертника приквіткового трава», «Безсмертника приквіткового квітки» та «Безсмертника приквіткового квіток рідкий екстракт».



## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Аналіз рослинної сировини та препаратів за стандартами лютеоліну та цинарозиду / Н. В. Попова та ін. *Вісник фармації*. 2010. № 4 (64). С. 50–54.
2. Аскерова Р. К. Род *Helichrysum* Mill. *Флора Азербайджана*. Баку, 1961. Т. 8. С. 215–221.
3. Атлас з анатомії рослин (рослинна клітина, тканини, органи) : навч. посіб. для студентів вищ. навч. закл. / А. Г. Сербін та ін. Харків : Колорит, 2006. 86 с.
4. Ахмедов Р. Б. Одолень–трава. Уфа : Китап, 1999. 309 с.
5. Баймухамбетов М. А., Комиссаренко Н. Ф. Кумарины *Helichrysum maracandicum*. *Химия природных соединений*. 1989. № 5. С. 722.
6. Баймухамбетов М. А., Никонов Г. К. *Helichrysum maracandicum* – новое сырье для получения желчегонных средств. *Растительные ресурсы*. 1983. Т. 19, № 1. С. 100.
7. Барыкина Р. П., Веселова Т. Д. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы. Москва : МГУ, 2004. 312 с.
8. Белая Н. И., Филиппенко Т. А., Николаевский А. Н. Особенности хемилюминесценции при ингибировании растительными фенолами окисления органических веществ. *Теоретическая и экспериментальная химия*. 2003. Т. 39, № 3. С. 161–166.
9. Беликов В. В., Точкова Т. В. Реакции комплексообразования в анализе флавоноидов. *Фенольные соединения и их физиологические свойства*. Алма-Ата, 1973. С. 168–172.
10. Бессмертник итальянский – перспективное лекарственное растение / Н. В. Попова и др. *Досягнення сучасної фармації та перспективи її розвитку у новому тисячолітті* : матеріали V Нац. з'їзду фармацевтів України, м. Харків, 1999 р. Харків, 1999. С. 322.
11. Бессмертник песчаный в некоторых районах лесостепной зоны Украины : сб. науч. работ / отв. ред. А. П. Исайкина. *ВНИИЛР*. 1975. № 8. С. 11–12.

12. Блажеєвський М. Є., Бондаренко Н. Ю. Кількісне визначення флавоноїдів хемілюмінесцентним методом в лікарських формах. *Фармаком.* 2005. № 2–3. С. 177–181.
13. Бондаренко Н. Ю., Блажеєвський М. Є. Визначення кофеїну у каві методом хемілюмінесценції. *Український біофармацевтичний журнал.* 2016. № 3. С. 14–18.
14. Бородин А. И., Богарада А. П., Максименко А. И. Выращивание бессмертника песчаного в лесостепной зоне УССР. *Растительные ресурсы.* 1973. Т. 9, № 3. С. 430–432.
15. Вивчення специфічної активності протимікробних лікарських засобів : метод. рек. / Ю. Л. Волянський та ін. Київ : Здоров'я, 2004. 38 с.
16. Види бессмертника в медицине и фармации / Н. В. Попова и др. *Застосування методів лікування і аніпрепаратів у медичній, фармацевтичній та косметичній практиці* : матеріали Всеукр. наук.–практ. конф. с міжнар. участю, м. Харків, 29–30 берез. 2018 р. Харків, 2018. С. 400–407.
17. Гланс С. Медико–биологическая статистика / пер. с англ. Ю. А. Данилова. Москва : Практика, 1998. 459 с.
18. Государственная Фармакопея СССР / М–во здравоохранения СССР. 11–е изд., доп. Москва : Медицина, 1987. Вып. 1. 336 с. ; Вып. 2. 400 с.
19. Державна Фармакопея України : в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2–ге вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2014. Т. 3. 732 с.
20. Державна Фармакопея України : в 3 т. / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2–ге вид. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2015. Т. 1. 1128 с.

21. Державна Фармакопея України / ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». 2–ге вид., 1 допов. Харків : ДП «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів», 2016. 360 с.
22. ДСТУ 3030–95 (ГОСТ 30278–95). Шампуні та піномийні засоби. Методи визначення стійкості до мікробного зараження ; чинний від 01.07.1996. Київ, 1996. 13 с.
23. Запесочная Г. Г., Дзядевич Г. В., Карасартов Б. С. Фенольные соединения *Helichrysum italicum*. *Химия природных соединений*. 1990. № 3. С. 409.
24. Ильин М. М. Каучуконосы флоры СССР: каучук и каучуконосы : в 2–х т. Москва, 1953. Т. 2. С. 9–104.
25. Исследование состава водного экстракта цветков бессмертника итальянского методом ВЭЖХ / Н. А. Тюкавкина и др. *Достижения в области фармацевтического и химико–токсикологического анализа*. Москва, 1990. С. 26–29.
26. Караев А. И., Алиев Р. К. Химический состав цветков бессмертника складчатого, произрастающего в Азербайджане и действие препарата на свертываемость крови. *Доклады АН АзССР*. 1955. Т. 11, № 7. С. 483–490.
27. Кирпичников М. Э. Цмин, бессмертник – *Helichrysum Mill*. *Флора СССР*. Москва ; Ленинград, 1959. Т. 25. С. 404–430.
28. Количественно–систематическое изучение крымско–кавказских видов рода бессмертник – *Helichrysum Mill* / О. А. Овдиенко и др. *Бюллетень МОИП*. 1977. Т. 82, № 2. С. 74–87.
29. Количественный анализ кофеиллпроизводных цветков бессмертника итальянского методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / К. С. Чолпонбаев и др. *Фармация*. 1991. Т. 40, № 2. С. 67.
30. Кудрявцева Т. В. Химическое изучение бессмертника итальянского (*Helichrysum italicum* (Roth.) Guss : автореф. дисс. ... канд. фармацевт. наук. Москва, 1992. 25 с.

31. Куркина А. В. Методика количественного определения суммы флавоноидов в траве репешка аптечного. *Химико–фармацевтический журнал*. 2011. Т. 45, № 1. С. 31–34.
32. Кучер М. М., Галькевич І. Й. Газорідинна хроматографія в аналізі ліків та отрут. Теоретичні основи методу. Львів : ЛНМУ, 2011. Т. 1. 236 с.
33. Лебедев А. Т. Масс–спектрометрия в органической химии. Москва : БИНОМ, 2003. 493 с.
34. Лікарський засіб антимікробної та протигрибкової дії на рослинній основі : пат. 145563 Україна. № и 202003644 ; заявл. 18.06.2020 ; опубл. 28.12.2020, Бюл. № 24.
35. Литвиненко В. И. Некоторые принципы и методические разработки в исследовании фенольных соединений. *Современные проблемы фармацевтической науки и практики*. Киев, 1972. С. 674–676.
36. Литвиненко В. И., Максютин Н. П. Спектральные исследования флавоноидов. Обнаружение свободных фенольных оксигрупп в различных положениях. *Химия природных соединений*. 1965. № 6. С. 420–426.
37. Литвиненко В. И., Попова Н. В., Волькович О. О. *Фармаком*. 2001. № 1. С. 9–15.
38. Лютеолин и его производные / Н. В. Попова и др. Курск : Изд–во Курского гос. мед. ун-та, 2011. 103 с.
39. Максютин Н. П., Литвиненко В. И. Методы выделения и исследования флавоноидных соединений и их биологические функции. Москва : Наука, 1968. С. 27–28.
40. Мелкумян И. С., Мусаелян М. С. Некоторые данные по физиологической активности видов *Helichrysum*. *Фитонциды. Результаты, перспективы и задачи исследования*. Киев, 1972. С. 74–75.
41. Москаленко А. М., Попова Н. В. Вивчення летких сполук у сировини безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*). *Український біофармацевтичний журнал*. 2020. № 4 (65). С. 70–76.

42. Москаленко А. М., Попова Н. В. Дослідження вуглеводів безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*). *Український біофармацевтичний журнал*. 2018. № 3 (56). С. 53–59.
43. Москаленко А. М., Попова Н. В. Дослідження мінерального складу сировини безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*). *Український біофармацевтичний журнал*. 2018. № 1 (54). С. 72–76.
44. Москаленко А. М., Попова Н. В. Дослідження органічних кислот сировини безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*). *Український біофармацевтичний журнал*. 2019. № 4 (61). С. 65–69.
45. Москаленко А. М., Попова Н. В. Дослідження складу жирних кислот безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*). *Український біофармацевтичний журнал*. 2018. № 4 (57). С. 64–68.
46. Москаленко А. М., Попова Н. В. Дослідження фенолокарбонових кислот сировини безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*). *Український біофармацевтичний журнал*. 2019. № 3 (60). С. 77–82.
47. 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. Vol. 1, № 56. P. 43–49.
48. Москаленко А. М., Попова Н. В. Особливості анатомічної будови безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*). *Фітотерапія. Часопис*. 2020. № 2. С. 64–74.
49. 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.
50. Москаленко А. Н., Попова Н. В., Литвиненко В. И. Исследования фенольных соединений травы бессмертника прицветникового. *Фенольные соединения: свойства, активность, инновации* : сб. науч. ст. по материалам X Междунар. симп. «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты», г. Москва, 14–19 мая 2018 г. Москва : ИФР РАН, 2018. С. 335–339.

51. Овдиенко О. А. Крымско–кавказские виды рода *Helichrysum* (Mill) Guss (эколого-географическое, морфологобиологическое, фитохимическое, систематическое изучение и перспективы использования) : автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Донецк, 1977. 34 с.
52. Оленников Д. Н., Танхаева Л. М. Методика количественного определения группового состава углеводного комплекса растительных объектов. *Химия растительного происхождения*. 2006. № 4. С. 29–33.
53. Определение качественного и количественного состава флавоноидных соединений медуницы неясной / В. С. Казакова и др. *Научные ведомости БелГИУ. Серия : Медицина. Фармация*. 2012. № 18. С. 46–50.
54. Осипова Е. А. Интродукция *Helichrysum italicum* (Roth.) Guss в Крыму, его биология, эфиромасличность и перспективы использования : автореф. дисс. ... канд. биол. наук. Донецк, 1973. 23 с.
55. Полежаева И. В., Полежаева Н. И., Меняйло Л. Н. Аминокислотный и минеральный состав вегетативной части *Chamerion angustifolium* (L.) Holub. *Химико–фармацевтический журнал*. 2007. № 3. С. 27–29.
56. Попова Н. В., Волькович О. О. Фітохімічне вивчення цмину італійського. *Тези доповідей студентської наукової конференції*. Харків, 1998. С. 86.
57. Попова Н. В., Литвиненко В. И., Куцанян А. С. Лекарственные растения мировой флоры. Харьков : Діса плюс, 2016. 540 с.
58. Почему растения лечат / М. А. Ловкова и др. Москва : Наука, 1989. 254 с.
59. Практикум з ідентифікації лікарської рослинної сировини : навч. посіб. / В. М. Ковальов та ін. Тернопіль : ТДМУ, 2014. 264 с.
60. Скакун М. П., Посохова К. А. Основы фармакологии с рецептурой : підруч. для студентів вищ. мед. навч. закл. I–II рівнів акредитації. 2–ге вид., перероб. та допов. Тернопіль : Укрмедкнига, 2004. 606 с.
61. Смирнова А. П., Первых Л. Н. Количественное определение суммы флавоноидов в цветках бессмертника песчаного. *Химико–фармацевтический журнал*. 1998. Т. 32, № 6. С. 35–38.

62. Смолянская Т. И. Некоторые результаты исследования эфирных масел бессмертника итальянского. *Бюллетень Государственного Никитского ботанического сада*. 1973. № 2. С. 26–29.
63. Сравнительное фитохимическое изучение соцветий различных видов бессмертника / О. А. Овдиенко и др. *Химико–фармацевтический журнал*. 1977. Т. 11, № 10. С. 102–105.
64. Стандартизація приготування мікробних суспензій : інформ. лист про нововведення в системі охорони здоров'я № 163–2006 / Ю. Л. Волянський та ін. Київ, 2006. 3 с.
65. Фенольні сполуки та антиоксидантна активність безсмертника приквіткового (*Helichrysum bracteatum*) / А. М. Москаленко та ін. *Український біофармацевтичний журнал*. 2019. № 2 (59). С. 76–80.
66. Фенольні сполуки цмину та їх біологічна активність / С. И. Прокопенко та ін. *Фармацевтический журнал*. 1972. № 4. С. 37.
67. Фурст Г. П. Методы анатомо–гистохимического исследования растительных тканей. Москва : Наука, 1979. 154 с.
68. Халафян А. А. STATISTICA 6. Статистический анализ данных : учеб. 3–е изд. Москва : ООО «Бином–Пресс», 2007. 512 с.
69. Флора Европейской части СССР / отв. ред. Н. Н. Цвелев. Санкт–Петербург : Наука, 1994. Т. 7. 317 с.
70. Цвелев Н. Н. Семейство Астровые. *Флора Европейской части СССР. Новости систематики высших растений*. Ленинград, 1990. Т. 27. С. 145–152.
71. Цуркан О. О., Ковальчук Т. В., Гергель О. В. Хромато–мас–спектрометричне дослідження летких компонентів надземної частини шовковиці. *Фармакологія та лікарська токсикологія*. 2012. № 1 (26). С. 54–59.
72. Чиркина Н. Н., Осипова Е. А. Антимикробные свойства эфирных масел бессмертника итальянского. *Биологические науки*. 1974. № 1(12). С. 86–89.

73. Чолпонбаев К. С. Анализ и стандартизация водного экстракта цветков бессмертника итальянского : автореф. дисс. ... канд. фармацевт. наук. Москва, 1990. 25 с.
74. Чолпонбаев К. С., Ручкин В. Е., Тюкавкина Н. А. Кофеоилхинные кислоты водного экстракта цветков бессмертника итальянского. *Здравоохранение Киргизии*. 1990. № 2. С. 29–30.
75. Шаршунова М., Шварц В., Михалец Ч. Тонкослойная хроматография в фармации и клинической биохимии : в 2-х ч. Москва : Мир, 1980. Ч. 2. 297 с.
76. Шохина Н. К., Валуцкая А. Г. Опыт интродукции *Helichrysum arenarium* (Z.) Moench в Новосибирскую область. *Растительные ресурсы*. 1984. № 4. С. 515–524.
77. Шретер А. И., Исайкина А. Л. Географическое распространение и природные запасы бессмертника песчаного на Украине. *Растительные ресурсы*. 1974. Т. 10, № 1. С. 19–26.
78. Шхнян А. С. Род *Helichrysum* Mill в Армении. *Новости систематики высших растений*. 1986. Т. 23. С. 198–205.
79. Эльшами И. Э. Получение и исследование полисахаридов соцветий бессмертника песчаного : автореф. дисс. ... канд. фармацевт. наук. Харьков, 1979. 22 с.
80. Analysis of the monosaccharide composition of purified polysaccharides in *Ganoderma atrum* by capillary gas chromatography / Y. I. Chen et al. *Phytochem. Anal.* 2009. Vol. 20 (6). P. 38–40.
81. Anderberg A. A., Haegi L. Taxonomy and Phylogeny of the Tribe Gnaphalieae (Asteraceae). *Opera Botanica*. 1991. Vol. 104. P. 1–195.
82. Andrews H. C. The Botanist's Repository for New, and Rare Plants. London, 1805. 428 p.
83. Australian Daisy Study Group Everlasting Daisies of Australia / Barker Judy et al. Melbourne : Shannon Books, 2002. 63 p.



84. Chemical constituents of the flowers of *Helichrysum bracteatum* / H. Y. Liu et al. *Natural Product Research and Development*. 2007. Vol. 19, № 423. P. 6.
85. Cubukcu B., Yuksel V. Constituents of anatolian medicinal plants. Flavonoids of *Helichrysum armenium*. *J. Nat. Prod.* 1982. Vol. 45, № 2, P. 137–139.
86. Dashek W. V. *Methods in Plant Electron Microscopy and Cytochemistry*. New York : Humana Press, 2000. 301 p.
87. Effects of *Helichrysum bracteatum* flower extracts on UVB irradiation-induced inflammatory biomarker expression / Y. J. Kim et al. *Biomedical Dermatology*. 2019. Vol. 3, Issue 1. P. 1–6.
88. Facino R. M., Carini M., Franzol L. Phytochemical characterization and radical scavenger activity of flavonoids from *Helichrysum italicum* G.Don (Compositae). *Pharmacol. Res.* 1990. Vol. 22, № 6. P. 709–721.
89. *Farmacopea Polska*. Warszawa : PZWL, 1970. T. 2. 872 p.
90. Garces R., Mancha M. One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Anal. Biochem.* 1993. Vol. 211, № 1. P. 139–143.
91. Gardner C. A. *Wildflowers of Western Australia*. 17th ed. Perth, Western Australia : St. GeorgBooks, 1990. 144 p.
92. Guerrant G. O., Moss C. W. Determination of monosaccharides as aldonitrile, O-methyloxime, alditol, and cyclitol acetate derivatives by gas-chromatography. *Analytical Chemistry*. 1984. Vol. 56, № 4. P. 633–638.
93. Harborne J. B., Mabry T. J. *The flavonoids: Advances in Research*. London : Chapman and Hall, 1982. 744 p.
94. Investigation on Eco-Friendly Natural Dyes: Chemistry, Dyeing and Antimicrobial Properties of *Helichrysum bracteatum* / R. Sivakumar et al. *Asian Journal of Chemistry*. 2009. Vol. 21, № 8. P. 5960–5966.
95. Jámbor A., Molnár-Perl I. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethoxycarbonyl chloride. *Journal of Chromatography*. 2009. Vol. 16. P. 3064–3077.

96. Justesen U., Knuthsen P., Leth T. Determination of plant polyphenols in Danish foodstuffs by HPLC-UV and LC-MS detection. *Cancer Letters*. 1997. Vol. 114, № 1–2. P. 165–167.
97. Kavimani S., Mounissamy V. M., Gunasegaran R. Analgesic and antiinflammatory activities of hispidulin isolated from *Helichrysum bracteatum*. *Indian Drugs (Bombay)*. 2000. Vol. 37, № 582. P. 4.
98. Mericli A. H. Helipyronone and 5-metoxy-7-hydroxyphtalide from *Helichrisum plicatum* D.C. *Istanbul univ/ eczacilik fak mecm.* 1983. № 19. P. 65–69.
99. 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.
100. 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, 18–20 April 2018. Kharkiv : NuPh, 2018. P. 56.
101. 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, 10–12 April 2019. Kharkiv : NuPh, 2019. P. 51.
102. Rapid, accurate, sensitive and reproducible HPLC analysis of amino acids. Amino acids analysis using zorbax eclipse – AAA columns and the agilent 1100 HPLC / J. Henderson et al. *Agilent Technical Note*. 1999. P. 980–1193.
103. Reynolds L. E., Martindeile F. The extra Pharmacopea. 29 ed. London : Pharm. press., 1989. 1896 p.
104. Identification of phenolic compounds in strawberries by liquid chromatography electrospray ionization mass spectroscopy / N. P. Seeram et al. *Food Chemistry*. 2006. Vol. 97, №. 1. P. 1–11.
105. Sivakumar R., Nair A.G.R., Madhusudanan K. P. Polyphenolic compounds of flowers of *Helichrysum bracteatum*. *Current Science*. 1995. № 1 (69). P. 51–89.

106. Van Puyvelde L., De Kimpe N., Schamp N. Isolation of flavonoids and a chalcone from *Helichrysum odoratissimum* and synthesis of helichrysetin. *J. Nat. Prod.* 1989. Vol. 52, № 3. P. 629–633.
107. Ventenat E. P. *Jardin de la Malmaison*. Paris, 1803. 258 p.
108. Violeta N., Trandafir I., Ionica M. E. HPLC organic acid analysis in different citrus juices under reversed phase conditions. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*. 2010. Vol. 38, № 1. P. 44–48.
109. Vrkoc J., Ubik K., Sedmera P. Phenolic extractives from the achems of *Helichrysum arenarium*. *Phytochemistry*. 1973. Vol. 12, № 8. P. 2062.

## **ДОДАТКИ**

## Додаток А

## 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 в 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 в 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 в 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 в 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 в 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 в 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 в плануванні експерименту, 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 в 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 в 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 202003644; заявл. 18.06.2020; опубл. 28.12.2020, Бюл. № 24 (Особистий внесок – брав участь в патентному пошуку, одержанні лікарського засобу та оформленні патенту).
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.

Продовж. дод. А

### **Апробація результатів дисертації**

Основні положення роботи викладено та обговорено на науково-практичних конференціях різного рівня:

1. XXV International Scientific and Practical Conference of young Scientists and students «Topical issues of new drugs developments» (Kharkiv, 18-20 April 2018, form of participation – abstract)

2. 9th International Pharmaceutical Conference «Scientific and Practical» (Lithuania Kaunas, 09 November 2018, form of participation – abstract)

3. XXVI International Scientific and Practical Conference of young Scientists and students «Topical issues of new drugs developments» (Kharkiv, 10-12 April 2019, form of participation – abstract);

4. XXVII Міжнародн науково-практичної конференції молодих вчених та студентів «Актуальні питання створення нових лікарських засобів» (Харків, 08-10 квітня 2020 р., форма участі – публікація тез).



## Додаток Б

ПРОСКТ

Проректор НФаУ з науково-педагогічної роботи (інноваційної та науково-дослідної) д. фарм. н., проф. Інна ВЛАДИМИРОВА



» лютого 2021 р.

Заявник, країна: Національний фармацевтичний університет, Україна.

Виробник, країна: Україна.

**МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ**

*Helichrysi bracteati herba*

**Безсмертника приквіткового трава**

Лікарська рослинна сировина у мішках з тканини

## Продовж. дод. Б

**УПАКОВКА**

В мішках з тканини, 10,0 кг.

**МАРКУВАННЯ**

Безсмертника приквіткового трава, *Helichrysi bracteati herba*, 10,0 кг, НФаУ,  
Харківська обл, м. Зміїв, липень 2020, партія № 7,

**ТРАНСПОРТУВАННЯ**

У спеціальному транспорті, призначеному для транспортування лікарських засобів та лікарської рослинної сировини.

**УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ**

У сухих, провітрюваних приміщеннях, при температурі 10-12°C, на стелажах,  
на відстані не менш 15 см від підлоги та 25 см від стін.

**ТЕРМИН ПРИДАТНОСТІ**

2 роки.

**Антимікробний засіб для зовнішнього застосування**

**Професор кафедри хімії  
природних сполук і нутриціології,  
доктор фармацевтичних наук,  
професор**

**Н.В. Попова**

«16» лютого 2021 г.

**Аспірант кафедри хімії природних  
сполук і нутриціології**

**А.М. Москаленко**

«16» лютого 2021 г.

Продовж. дод. Б

ПРОЄКТ



Проректор НФаУ з науково-педагогічної роботи (інноваційної та науково-дослідної) д. фарм. н., проф.  
Інна ВЛАДИМИРОВА

«16» лютого 2021 р.

Заявник, країна: Національний фармацевтичний університет, Україна.

Виробник, країна: Україна.

## МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

*Helichrysi bracteati flores*

**Безсмертника приквіткового квітки**

Лікарська рослинна сировина у мішках з тканини

## Продовж. дод. Б

**УПАКОВКА**

В мішках з тканини, 10,0 кг.

**МАРКУВАННЯ**

Безсмертника приквіткового квітки, *Helichrysi bracteati flores*, 10,0 кг, НФаУ,  
Харківська обл, м. Зміїв, липень 2020, партія № 7,

**ТРАНСПОРТУВАННЯ**

У спеціальному транспорті, призначеному для транспортування лікарських засобів та лікарської рослинної сировини.

**УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ**

У сухих, провітрюваних приміщеннях, при температурі 10-12°C, на стелажах,  
на відстані не менш 15 см від підлоги та 25 см від стін.

**ТЕРМИН ПРИДАТНОСТІ**

2 роки.

Антимікробний засіб для зовнішнього застосування

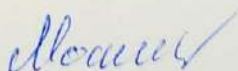
Професор кафедри хімії  
природних сполук і нутриціології,  
доктор фармацевтичних наук,  
професор



Н.В. Попова

«16» лютого 2021 г.

Аспірант кафедри хімії природних  
сполук і нутриціології



А.М. Москаленко

«16» лютого 2021 г.

Продовж. дод. Б

ПРОЄКТ



Проректор НФаУ з науково-педагогічної роботи (інноваційної та науково-дослідної) д. фарм. н., проф. Інна ВЛАДИМИРОВА

» лютого 2021 р.

Заявник, країна: Національний фармацевтичний університет, Україна.

Виробник, країна: Україна.

## МЕТОДИ КОНТРОЛЮ ЯКОСТІ

*Helichrysi bracteati flores liquida extractum*

Безсмертника приквіткового квіток рідкий екстракт

Лікарській засіб для зовнішнього застосування



## Продовж. дод. Б

знаходять вміст спирту у відсотках за об'ємом. Вміст етанолу у препараті має бути не менше 65,0 % (об/об).

Об'єм вмісту пакування. Випробування проводять з 10 банок за допомогою мірного циліндру місткістю 100 мл. Об'єм вмісту пакування має бути від 97 мл до 103 мл.

**УПАКОВКА**

Флакони по 100 мл, в картонній упаковці.

**МАРКУВАННЯ**

Безсмертника приквіткового квіток рідкий екстракт, *Helichrysi bracteati flores liquida extractum*, 100 мл во флаконах для зовнішнього застосування, серія, кінцевий термін застосування, НФаУ, м. Харків.

**ТРАНСПОРТУВАННЯ**

У спеціальному транспорті, призначеному для транспортування лікарських засобів та лікарської рослинної сировини.

**УМОВИ ЗБЕРІГАННЯ**

У сухих, провітрюваних приміщеннях, при температурі 10-12°C, на стелажах, на відстані не менш 15 см від підлоги та 25 см від стін.

**ТЕРМИН ПРИДАТНОСТІ**

2 роки.

**Антимікробний засіб для зовнішнього застосування**

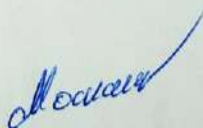
**Професор кафедри хімії  
природних сполук і нутриціології,  
доктор фармацевтичних наук,  
професор**



**Н.В. Попова**

«16» лютого 2021 г.

**Аспірант кафедри хімії природних  
сполук і нутриціології**



**А.М. Москаленко**

«16» лютого 2021 г.

## Додаток В



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **145563** (13) **U**  
 (51) МПК (2021.01)  
**A61K 36/00**

НАЦІОНАЛЬНИЙ ОРГАН  
 ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
 ВЛАСНОСТІ  
 ДЕРЖАВНЕ ПІДПРИЄМСТВО  
 "УКРАЇНСЬКИЙ ІНСТИТУТ  
 ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
 ВЛАСНОСТІ"

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: **u 2020 03644**  
 (22) Дата подання заявки: **18.06.2020**  
 (24) Дата, з якої є чинними  
 права інтелектуальної  
 власності: **29.12.2020**  
 (46) Публікація відомостей  
 про державну  
 реєстрацію: **28.12.2020, Бюл.№ 24**

(72) Винахідник(и):  
**Москаленко Андрій Миколайович (UA),  
 Попова Наталія Вячеславівна (UA)**  
 (73) Володілець (володільці):  
**МОСКАЛЕНКО АНДРІЙ МИКОЛАЙОВИЧ,  
 пров. 1-го Травня, буд. 6, м. Зміїв,  
 Харківська обл., 63404 (UA),  
 ПОПОВА НАТАЛІЯ ВЯЧЕСЛАВІВНА,  
 пров. 23 Серпня, буд. 10, кв. 46, м. Харків,  
 61018 (UA)**  
 (74) Представник:  
**Лерантович Єліна Томашівна,  
 реєстр. №285**

**(54) ЛІКАРСЬКИЙ ЗАСІБ АНТИМІКРОБНОЇ ТА ПРОТИГРИБКОВОЇ ДІЇ НА РОСЛИННІЙ ОСНОВІ****(57) Реферат:**

Лікарський засіб антимікробної та протигрибкової дії на рослинній основі містить витяжки з природних компонентів. Як витяжку з природних компонентів використовують екстракт квіток безсмертника приквіткового на 70 % етиловому спирті при співвідношенні сировини і готового екстракту 1:5.

**UA 145563 U**

## Додаток Г

«ЗАТВЕРДЖУЮ»



Проректор НФаУ з науково-педагогічної роботи (інноваційної та науково-дослідної) д. фарм. н., проф. Інна ВЛАДИМИРОВА

« 25 » вересня 2020 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Результати вивчення особливості анатомічної будови сировини безсмертника приквіткового.
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра хімії природних сполук і нутриціології. Москаленко А.М. – здобувач каф. ХПС.
3. **Джерела інформації:** Москаленко А.М. Особливості анатомічної будови безсмертника приквіткового (*HELICHRYSUM BRACTEATUM*) / А.М. Москаленко, Н.В. Попова // Фітотерапія. Часопис. – 2020.– №2. С. 64-74.
4. **Де впроваджено:** кафедра ботаніки Національного фармацевтичного університету.
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота, в лекційному курсі.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань з питань анатомічної будови лікарської рослинної сировини.
7. **Строки впровадження:** 2020 -2021 навч. рік.

Завідувач кафедри ботаніки  
Національного фармацевтичного  
університету  
д. фарм. наук, проф.

Тетяна ГОНТОВА



Продовж. дод. Г

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор з наукової роботи

Тернопільського національного

медичного університету

імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

проф. І.М. Кліщ



« 12 грудня » 2020 р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Результати вивчення особливості анатомічної будови сировини безсмертника приквіткового.
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра хімії природних сполук і нутриціології. Москаленко А.М. – здобувач каф. хімії природних сполук і нутриціології.
3. **Джерела інформації:** Москаленко А.М. Особливості анатомічної будови безсмертника приквіткового (*HELICHRYSUM BRACTEATUM*) / А.М. Москаленко, Н.В. Попова // Фітотерапія. Часопис. – 2020. – № 2. С. 64-74.  
**Де впроваджено:** кафедра фармакогнозії з медичною ботанікою Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського.
4. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота, в лекційному курсі.
5. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань з питань анатомічної будови лікарської рослинної сировини.
6. **Строки впровадження:** 2020 -2021 навчальний рік.

Завідувач кафедри  
 фармакогнозії  
 з медичною ботанікою  
 Тернопільського національного  
 медичного університету  
 імені І. Я. Горбачевського МОЗ України,  
 д.фарм.н, професор

С. М. Марчишин

Продовж. дод. Г

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**

Ректор Ніжинського державного  
університету імені Миколи Гоголя  
к. істор. н., доц  
Олександр САМОЙЛЕНКО  
«*dd*» \_\_\_\_\_ 2020 р.

**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

1. **Найменування пропозиції**  
для впровадження: Результати вивчення особливості анатомічної будови сировини безсмертника приквіткового.
2. **Установа, автор:**  
Національний фармацевтичний університет, кафедра хімії природних сполук і нутриціології. Москаленко А.М. – здобувач каф. хімії природних сполук і нутриціології.
3. **Джерела інформації:**  
Москаленко А.М. Особливості анатомічної будови безсмертника приквіткового (*HELICHRYSUM BRACTEATUM*) / А.М. Москаленко, Н.В. Попова // Фітотерапія. Часопис. – 2020.– №2. С. 64-74.
4. **Де впроваджено:** кафедра хімії та фармації Ніжинського державного університету імені Миколи Гоголя.
5. **Форма впровадження:**  
науково-дослідна робота, в лекційному курсі.
6. **Ефект від впровадження:**  
поглиблення знань з питань анатомічної будови лікарської рослинної сировини.
7. **Строки впровадження:** 2020 - 2021 навч. рік.

Завідувач кафедри хімії та фармації  
Ніжинського державного університету  
Імені Миколи Гоголя,  
д. хім. наук, проф.



*Володимир СУХОВЄЄВ*  
Володимир СУХОВЄЄВ



Продовж. дод. Г



Проректор НФаУ з науково-

педагогічної роботи (інноваційної та науково-дослідної) д. фарм. н., проф.

Інна ВЛАДИМИРОВА

«вересня» 2021 р.

### АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** Результати вивчення особливості анатомічної будови сировини безсмертника приквіткового.
2. **Установа, автор:** Національний фармацевтичний університет, кафедра хімії природних сполук і нутриціології. Москаленко А.М. – здобувач каф. ХПСіН.
3. **Джерела інформації:** Москаленко А.М. Особливості анатомічної будови безсмертника приквіткового (*HELICHRYSUM BRACTEATUM*) / А.М. Москаленко, Н.В. Попова // Фітотерапія. Часопис. – 2020.– №2. С. 64–74.
4. **Де впроваджено:** кафедра фармакогнозії Національного фармацевтичного університету.
5. **Форма впровадження:** науково-дослідна робота, в лекційному курсі.
6. **Ефект від впровадження:** поглиблення знань з питань анатомічної будови лікарської рослинної сировини.
7. **Строки впровадження:** 2020 -2021 навч. рік.

Завідувач кафедри фармакогнозії  
Національного фармацевтичного  
університету  
д. фарм. наук, проф.

Олег КОШОВИЙ