

На правах рукописи

КУЛИЧЕНКО ЕВГЕНИЯ ОЛЕГОВНА

**Биологически активные соединения в растениях вида космея
дваждыперистая (*Cosmos bipinnatus Cav.*)**

3.4.2 - Фармацевтическая химия и фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени
кандидата фармацевтических наук

Пятигорск– 2022

Работа выполнена в Пятигорском медико-фармацевтическом институте— филиале федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор,
заслуженный работник ВШ РФ

Оганесян Эдуард Тоникович

Официальные оппоненты:

Зилфикаров Ифрат Назимович – доктор фармацевтических наук, профессор РАН, главный научный сотрудник отдела химии природных соединений ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации

Федосеева Людмила Михайловна – доктор фармацевтических наук, профессор, профессор кафедры фармации федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Алтайский государственный университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Курский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «__» _____ 2022 года в _____ часов на заседании диссертационного совета 21.2.005.05 при ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (357532, Ставропольский край, г.Пятигорск, пр. Калинина, 11).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (357532, Ставропольский край, г. Пятигорск, пр. Калинина, 11) и на сайте <http://www.pmedpharm.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 2022 г

Ученый секретарь диссертационного совета

Ремезова Ирина Петровна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Основанием для применения препаратов растительного происхождения в качестве лечебно-профилактических средств практически всегда служит эмпирический опыт народной медицины. Потенциальная фармакологическая активность большинства лекарственных растений, используемых в медицине, обоснована и подтверждена экспериментально, благодаря чему в настоящее время большую долю фармацевтического рынка составляют препараты растительного происхождения. Доказано, что суммарные субстанции из растительного сырья обладают более выраженным эффектом, чем индивидуальные вещества той же природы. Множество синтетических соединений получено путем полусинтеза на основе природных или являются их аналогами.

В качестве лекарственных средств растительного происхождения используются такие фармакологические группы препаратов, как венотоники (препараты, содержащие флавоноиды рутин, гесперидин, диосмин, нарингенин и др), холиноблокаторы (алкалоиды атропин, скополамин), анальгетики (морфин), спазмолитики (папаверин), сердечные гликозиды (дигоксин, строфантин) и многие другие.

Богатая флора нашей страны обладает большим запасом дикорастущих и декоративных видов растений, лечебные свойства и химический состав которых мало изучены. Возможно, именно они могут являться перспективными источниками для получения биологически активных веществ. С этой точки зрения определённый интерес представляет космея дваждыперистая (*Cosmos bipinnatus Cav.*).

Хотя представители рода *Cosmos* не являются фармакопейными и не используются в медицинской практике, однако многие из них достаточно широко используются в народной медицине Северной и Южной Америки,

Японии, Китае, Тайланде и Индии. В традиционной медицине народов Бразилии используются семена и надземные части представителей рода *Cosmos Cav.* при таких проявлениях малярии, как желтуха, перемежающаяся лихорадка, спленомегалия. Описано применение растения в народной медицине в качестве общетонизирующего, желчегонного, гепатопротекторного средства. В традиционной медицине Басуто растение используется при головной боли, расстройствах желудка и как инсектицидное средство. В восточной традиционной медицине (Япония, Китай) космея дваждыперистая используется как тонизирующее и бодрящее средство в качестве заменителя лотоса.

Исходя из всего вышеописанного считаем, что изучение космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus Cav.*), характеризующейся широким спектром фармакологического действия и доступностью как сырьевого источника, представляет значительный интерес и является актуальной проблемой.

Степень разработанности темы исследования. Космея дваждыперистая (*Cosmos bipinnatus Cav.*) – легко культивируемое растение, характеризующееся обширной биомассой. Химический состав космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus Cav.*), согласно данным литературы, интересен по содержанию биологически активных веществ, которые представлены, в основном, флавоноидами, эфирными маслами (монотерпены, сесквитерпены), тритерпеновыми гликозидами и другими, но они изучены недостаточно. В литературе отсутствуют сведения о получении активных суммарных субстанций из космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus Cav.*) и исследовании их фармакологической активности. Отсутствуют сведения о качественном и количественном содержании флавоноидов и полисахаридном составе космеи дваждыперистой, произрастающей на Северном Кавказе. Отсутствуют сведения об изучении

физико-химических свойств полисахаридов космеи дваждыперистой и их сорбционной активности.

Цель и задачи исследования. На основании изложенных выше сведений можно сделать вывод о недостаточном уровне изученности биологической активности соединений космеи дваждыперистой с целью возможного практического использования в медицине и фармации. В этой связи *целью нашей работы является проведение углубленных химических исследований основных классов биологически активных соединений трех сортов космеи дваждыперистой («Dazzler», «Purity», «Rosea»), а также изучение спектра возможной биологической активности суммарных субстанций, полученных из космеи дваждыперистой.*

Для реализации цели исследования сформулированы следующие задачи:

1. изучить основные группы биологически активных соединений, а именно, флавоноидов, органических кислот, иридоидов, антоцианов, катехинов, аминокислот, макро- и микроэлементов, антиоксидантов, полисахаридов и др.;
2. определить количественное содержание аминокислот, макро- и микроэлементов, антиоксидантов, органических кислот, антоцианов, фенольных соединений, флавоноидов и суммарных фракций полисахаридов;
3. выделить суммарные фракции полисахаридов и изучить физические и химические свойства пектиновых веществ;
4. изучить полифенольный состав цветков космеи дваждыперистой и количественно определить содержание некоторых их компонентов;
5. разработать методику количественного определения халкона - битеина в сырье космеи дваждыперистой с использованием твердофазной экстракции;

6. провести предварительный фармакологический скрининг извлечений, полученных из космеи дваждыперистой – *Cosmos bipinnatus* Cav.;

7. получить суммарную субстанцию полифенолов из космеи дваждыперистой – *Cosmos bipinnatus* Cav. с целью их последующего фармакологического изучения.

Научная новизна работы состоит в том, что впервые подробно изучен химический состав надземных органов разных сортов космеи дваждыперистой, выделены фракции полисахаридов и охарактеризованы их физико-химические свойства, исследован полифенольный состав извлечений космеи дваждыперистой, разработана методика количественного определения битеина в извлечении космеи дваждыперистой с использованием метода твердофазной экстракции. Приоритетом исследований явилось также изучение биологических и фармакологических свойств отдельных фракций из космеи, что позволило выявить такие виды активностей, как антиоксидантная, гиполипидемическая, противовоспалительная, антимикробная и противогрибковая.

В космее дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus* Cav.) (соцветиях и траве) выявлен качественный и количественный состав основных групп соединений, таких как: флавоноиды, органические кислоты, иридоиды, антоцианы (в сортах «Rosea» и «Dazzler»), катехины (в сорте «Purity»), антиоксиданты, аминокислоты, макро- и микроэлементы и др.

Из травы космеи дваждыперистой разных сортов выделены полисахаридные комплексы: водорастворимые полисахариды (ВРПС), пектиновые вещества (ПВ), гемицеллюлоза А (Гц А) и гемицеллюлоза Б (Гц Б). Изучены физико-химические свойства выделенных полисахаридов, а также их моносакхаридный состав по данным кислотного гидролиза. Доказана высокая сорбционная способность водорастворимых полисахаридов и пектиновых веществ по отношению к ионам Pb^{2+} (от 70 до 92,5%).

Методом ВЭЖХ с применением масс- и УФ-детекции определен полифенольный состав извлечения цветков космеи дваждыперистой, полученного экстракцией 70%-ным спиртом этиловым. Осуществлен синтез бутеина, получен его стандарт, с помощью которого разработана методика количественного определения бутеина в сырье космеи дваждыперистой с применением твердофазной экстракции.

Впервые осуществлен фармакологический скрининг субстанций, полученных из космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus* Cav.). Выявлены антиоксидантная (модель железо-индуцированное перекисное окисление липидов), гиполипидемическая (модель твиновой гиперлипидемии), противовоспалительная (модель ватной гранулемы), антимикробная и противогрибковая (метод серийных разведений) активности.

Теоретическая и практическая значимость работы. *Теоретическая значимость* работы заключается в расширении сведений о химическом составе космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus* Cav.), разработке методики количественного определения бутеина с применением твердофазной экстракции в сырье космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus* Cav.). Химические и фармакологические исследования суммарных субстанций космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus* Cav.) свидетельствуют о необходимости более углубленных их исследований с целью последующей рекомендации изучаемого растения в качестве лекарственного сырья.

Практическая значимость. По результатам исследований составлено и направлено в ФГБОУ ВО КГМУ МЗ РФ информационное письмо «Биологически активные соединения растений вида космея дваждыперистая (*Cosmos bipinnatus* Cav.)» с целью использования описанных в письме методик в учебном процессе (в т.ч. при выполнении курсовых и дипломных научно-исследовательских работ) для оптимизации способов выделения и изучения биологически активных полисахаридов и расширения сведений о

химическом составе и биологической активности представителей семейства сложноцветные (акты внедрения от 01.10.2020 г.).

По результатам диссертации составлено и направлено в ФГБОУ ВО СамГМУ МЗ РФ информационное письмо «Методика количественного определения битеина в извлечениях космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus Cav.*) методом ВЭЖХ с использованием твердофазной экстракции» с целью использования описанной в письме методики в учебном процессе для расширения сведений о химическом составе и биологической активности представителей семейства сложноцветные (акт внедрения от 05.09.2022 г.).

Методика количественного определения флавоноидов в цветках космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus Cav.*) семейства (*Asteraceae L.*) – внедрен в учебный процесс кафедры фармакогнозии, ботаники и фитопрепаратов ПМФИ-филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ (акт внедрения от 10.03.2021 г.); методика количественного определения антоцианов в цветках космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus Cav.*) семейства (*Asteraceae L.*) – внедрен в учебный процесс кафедры фармакогнозии, ботаники и фитопрепаратов ПМФИ-филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ МЗ РФ (акт внедрения от 01.03.2021 г.)

Методология и методы исследования. Методологической основой настоящей диссертационной работы служит патентно-информационный поиск по теме исследования, обобщение полученных данных и их описание в обзоре литературы. В исследованиях применялись современные методы физико-химических исследований: различные виды хроматографии, капиллярный электрофорез, титриметрический анализ, УФ-спектроскопия, ИК-спектроскопия, ВЭЖХ, хромато-масс-спектроскопия, твердофазная экстракция. Фармакологические исследования проводили на базе кафедры патологии и кафедры микробиологии и иммунологии с курсом биологической химии ПМФИ согласно методам «классической фармакологии» и современной микробиологии.

Положения, выносимые на защиту:

1. Химический состав соцветий и травы космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus Cav.*).
2. Выделение и изучение физико-химических характеристик фракций полисахаридов из травы космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus Cav.*).
3. Изучение полифенольного состава космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus Cav.*), синтез бутеина с целью получения стандартного образца для разработки методики количественного его определения в сырье космеи дваждыперистой с применением твердофазной экстракции;
4. Биологическая активность суммарных субстанций, полученных из соцветий космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus Cav.*);
5. Рекомендация космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus Cav.*) в качестве перспективного источника биологически активных соединений.

Степень достоверности и апробации результатов. Степень достоверности результатов определяется большим объемом информации, экспериментальными исследованиями и использованием современных химических, физико-химических и фармакологических методов исследования. Все результаты получены с применением методов статистической обработки результатов. Методики дифференциальной спектрофотометрии количественного определения флавоноидов провалидированы.

Основное содержание диссертационной работы представлены и доложены на международной научно-практической конференции «О некоторых вопросах и проблемах современной медицины» (г. Челябинск, Инновационный центр развития образования и науки, 11 июля 2017 г.), III международной научно-практической конференции «Современная химия – основа устойчивого развития» (г. Астрахань, издательский дом «Астраханский университет», 25-27 мая 2021 г.), международной научно-

практической конференции «Наукоемкие исследования как основа инновационного развития общества» (г. Уфа, 10 июня 2021 г.).

По теме диссертации опубликовано 11 научных работ, в том числе 4 в рецензируемых научных изданиях.

Личный вклад автора. Соискатель лично принимал активное участие на всех этапах выполнения диссертации: в патентно-информационном поиске, проведении химических и фармакологических исследований, описании и интерпретации результатов, а также оформлении текста статей по теме исследования. Статистическая обработка, обобщение результатов, их обсуждение и формирование выводов выполнялись автором самостоятельно.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы (глава 1), исследования химического состава (глава 2), выделения полисахаридов и изучения их физико-химических свойств (глава 3), исследования полифенольных соединений (глава 4), исследования биологической активности (5 глава), выводов, списка литературы и приложения. Библиография включает 160 ссылок, в том числе 89 зарубежных. Диссертация изложена на 213 страницах текста компьютерного набора, содержит 88 рисунков и 67 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Глава 1. Сведения о степени изученности химического состава и применении космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus* Cav.) (обзор литературы)

В данной главе описывается общее состояние исследований химического состава и фармакологической активности представителей рода *Cosmos* Cav. и растений вида *Cosmos bipinnatus* Cav.

Глава 2. Изучения основных групп биологически активных соединений растений вида космея дваждыперистая (*Cosmos bipinnatus* Cav.)

Предварительное исследование на наличие фенольных соединений в сырье осуществляли с использованием качественных реакций и бумажной хроматографии с последующим проявлением диагностическими реактивами.

На основании данных хроматографического анализа можно утверждать о наличии близких по структуре полифенольных соединений, отмечая при этом, что в наибольшем количестве они экстрагируются при использовании в качестве растворителя спирта этилового 95%. Наиболее четкое разделение флавоноидных гликозидов наблюдается при хроматографировании в 15%-ной уксусной кислоте.

Качественный состав органических кислот устанавливали методом ТСХ. В траве сорта «*Purity*» обнаружены 8 органических кислот, из которых идентифицированы 4; сорта «*Rosea*» - 6, идентифицированы - 2; сорта «*Dazzler*» - 7, идентифицированы 3 алифатические кислоты. Во всех исследуемых растениях присутствует янтарная кислота. Лимонная кислота идентифицирована только в траве сортов «*Purity*» и «*Dazzler*».

Наличие иридоидов в сырье определяли с помощью специфических реактивов.

Антоцианы обнаружены только в сортах «*Rosea*» и «*Dazzler*». Положительная реакция на катехины наблюдается у сорта «*Purity*».

Качественный и количественный аминокислотный состав надземной части космеи дваждыперистой исследован методом капиллярного электрофореза. В надземной части сорта «*Rosea*» установлено наибольшее содержание аминокислот. Для анализируемых сортов характерно высокое содержание заменимой аминокислоты пролина, в среднем, примерно, 85% от суммы всех аминокислот. Для всех сортов характерны такие незаменимые аминокислоты, как лейцин, метионин, валин, треонин. В сорте «*Purity*» их количество составляет 583,8 мг/кг – 7,65% от суммы всех аминокислот. Преобладающей незаменимой кислотой во всех исследуемых объектах

является треонин. Присутствие глутаминовой кислоты характерно только для сорта «*Dazzler*», а аспарагиновой кислоты - для сорта «*Rosea*».

Определение элементного состава космеи дваждыперистой проводили методом капиллярного электрофореза. Из полученных данных следует, что во всех исследуемых сортах наблюдается высокое содержание ионов калия и магния, а из микроэлементов - железа и бора; наибольшее содержание калия характерно для сорта «*Dazzler*», а железа и бора - для сорта «*Purity*».

Наличие антиоксидантов в пересчете на кверцетин и галловую кислоту определяли в спиртовых, водно-спиртовых и водных извлечениях на жидкостном хроматографе «Цвет Яуза-01-АА» (таблица 1).

Таблица 1 – Содержание антиоксидантов в различных извлечениях космеи дваждыперистой, полученных экстракцией 70%-ным спиртом этиловым

Сорт и сырье, экстрагент - 70%-ный C ₂ H ₅ OH	Площадь пика (S _п нА/с)	Содержание антиоксидантов(мг/г)	
		в пересчете на кверцетин	в пересчете на галловую кислоту
Трава сорта «Purity»	3384,705	2,58±0,004	1,6561±0,004
Соцветия сорта «Purity»	4694,11	3,171±0,006	2,048±0,004
Трава сорта «Rosea»	3174,92	0,819±0,008	0,5328±0,007
Соцветия сорта «Rosea»	4528,9	2,273±0,004	1,45±0,004
Трава сорта «Dazzler»	4205,13	1,814±0,005	1,1763±0,004
Соцветие сорта «Dazzler»	3812,402	2,106±0,005	1,372±0,005

Наибольшее количество антиоксидантов обнаружено в извлечениях, полученных экстракцией 70%-ным спиртом этиловым. Сравнивая содержание антиоксидантов в различных сортах и органах изучаемых растений, можно сделать вывод, что в соцветиях космеи дваждыперистой сорта «Purity» антиоксидантов значительно больше, чем в траве, что, возможно, обусловлено присутствием катехинов в этом сорте.

Содержание антоцианов в сортах «Rosea» и «Dazzler» определяли спектрофотометрически по методикам, рекомендованными ГФ XI и XIV.

Наибольшее содержание антоцианов наблюдается в соцветиях сорта «Dazzler» ($0,4 \pm 0,0082$) в траве сорта «Rosea» ($0,17 \pm 0,0053$) их содержание выше, чем в траве сорта «Dazzler» ($0,13 \pm 0,0056$).

Суммарное содержание антиоксидантов в анализируемых извлечениях в пересчете на галловую кислоту анализировали спектрофотометрически по реакции взаимодействия полученных извлечений с реактивом Фолина-Чокальтеу. Для исследования использовали водные, водно-спиртовые и спиртовые извлечения, полученные из космеи дваждыперистой.

Наибольшее количество фенольных соединений наблюдается в извлечениях сорта «Purity» космеи дваждыперистой ($2,786 \pm 0,0047$); несколько меньше их в сорте «Dazzler» ($2,306 \pm 0,008$); а наименьшее содержание полифенолов характерно для сорта «Rosea» ($1,632 \pm 0,005$).

Согласно ГФ XIV определение суммы флавоноидов проводили методом дифференциальной спектрофотометрии комплекса алюминия хлорида с анализируемыми извлечениями в пересчете на лютеолин, поскольку они характеризуются максимумом поглощения при длине волны 400 нм.

Проведена валидация методик количественного определения флавоноидов в извлечениях космеи дваждыперистой по критериям: специфичность, линейность, прецизионность.

Глава 3. Выделение полисахаридных комплексов, их моносахаридный состав и физико-химические свойства

Для выделения полисахаридных комплексов из травы космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus Cav.*) сортов «Purity», «Rosea», «Dazzler», нами использовано свежесобранное сырьё, высушенное воздушно-теневогой сушкой до постоянной массы.

Водорастворимые полисахариды (ВРПС), пектиновые вещества (ПВ), гемицеллюлоза А (ГцА) и гемицеллюлоза Б (ГцБ) выделены по методу Николая Константиновича Кочеткова и Михаэля Синнера.

Из травы трех сортов - «Purity», «Rosea», «Dazzler» получены пектиновые вещества, выход которых составляет от 4 до 8%.

Определён качественный и количественный состав водорастворимых полисахаридов, пектиновых веществ, гемицеллюлозы А и гемицеллюлозы Б.

Установлено наличие поверхностно-активных свойств пектиновых веществ и определены величины поверхностного натяжения, поверхностной активности, размеры молекул пектиновых веществ в поверхностном слое. Наибольшей способностью к снижению поверхностного натяжения растворителя обладает пектин из космеи дваждыперистой сорта «Purity».

Использование жидкостной экстракции и расчет коэффициента распределения позволяет оценить самопроизвольность перехода пектиновых веществ из водной в гидрофобную фазу.

Наибольшей сорбционной активностью по отношению к ионам Pb^{2+} и наименьшим коэффициентом распределения обладают пектиновые вещества космеи сорта «Rosea». С увеличением молярной массы возрастают не только адсорбционные, но и абсорбционные свойства пектиновых веществ всех сортов, о чем свидетельствуют данные по величинам коэффициента распределения и степени экстракции.

Установлено, что пектиновые вещества способны связывать ионы свинца и при этом процент связывания находится в пределах от 70 до 82,5%.

Установлено, что чем больше молекулярная масса образца, тем выше его сорбционная способность, причем она протекает по уравнению первого порядка.

Средняя молярная масса (г/моль) ПВ, выделенных из космеи дваждыперистой сортов: «Purity», «Rosea», «Dazzler», составляет 10071, 21615, 13715 соответственно.

Изучена зависимость вязкости растворов ПВ от pH среды: независимо от окраски цветов, молекулы полиэлектролитов находятся в изоэлектрическом состоянии при pH 4,7. В таком состоянии уменьшается процесс набухания, ускоряется застудневание и денатурация, отсутствует электрофоретическая подвижность данных молекул. Эти изменения следует учитывать при изготовлении лекарственных форм с использованием полученных ПВ.

Выявлена сорбционная способность водорастворимых полисахаридов, выделенных из сортов «Purity» и «Dazzler» по отношению к ионам Pb^{2+} и доказано, что скорость накопления катионов Pb^{2+} выше у ВРПС из сорта «Purity».

Зависимость величины адсорбции от равновесной концентрации ионов свинца подчиняется в одинаковой степени уравнениям Ленгмюра и Фрейндлиха, что может свидетельствовать о значительной пористости сорбентов и эффективности их использования в качестве энтеросорбентов.

Полученные данные позволяют сделать вывод о возможности использования ВРПС, полученных из сортов «Purity» и «Dazzler» для «извлечения» ионов свинца (II) из разных объектов, а также в качестве природных детоксикантов.

Глава 4. О полифенольном составе космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus Cav.*)

Для выявления полифенольного состава космеи дваждыперистой нами были использованы бумажная хроматография, твердофазная экстракция, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектральный анализ, ИК- и УФ-спектроскопия.

Двумерная хроматограмма извлечения, полученного экстракцией 70%-ным спиртом этиловым, свидетельствует о наличии 17 соединений полифенольной природы.

На хроматограмме 7 пятен в УФ-свете имеют коричневую окраску, переходящую под влиянием паров аммиака в ярко-желтую флуоресценцию, а под влиянием алюминия хлорида – в желтую флуоресценцию. Такое поведение характерно для флавонолов или флавонол-3-гликозидов.

Одно пятно в УФ-свете имеет зеленую флуоресценцию в отличие от двух флавоновых гликозидов, что характерно для гликозидов апигенина, а другое пятно в УФ-свете имеет коричневую окраску, переходящую в зеленовато-желтую, что указывает на его флавоновую природу.

Два пятна на хроматограммах имеют коричневую окраску, переходящую в красную под влиянием паров аммиака или красно-оранжевую при действии 5%-ного водного раствора карбоната натрия, что характерно для халконов.

По интенсивности окраски пятен нельзя судить о количественном содержании индивидуальных соединений, поэтому нами были использованы твердофазная экстракция, а также высокоэффективная жидкостная хроматография с хромато-масс- и ультрафиолетовой детекцией.

Компонентный состав извлечений определяли обращенно-фазовым вариантом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием УФ- и масс-детекторов.

ВЭЖХ-хроматограмма анализируемого извлечения, представлена на рисунке 1. Идентификацию отдельных соединений осуществляли в присутствии стандартных образцов (хлорогеновая кислота, рутин, бетеин), а также с использованием данных библиотеки масс-спектров NIST 18 и литературы (таблица 2).

Для доказательства природы агликонов и подтверждения результатов ВЭЖХ осуществлен кислотный гидролиз извлечения.

Хроматографический анализ агликонов, образовавшихся после кислотного гидролиза, свидетельствует о наличии 4-х производных 2-фенил-хромона и одного халкона – бетеина.

Двумерной хроматографией (первое направление система 60%-ная уксусная кислота, а второе – бутанол – уксусная кислота – вода (4:1:2)) с использованием «свидетелей» идентифицированы кверцетин, лютеолин, апигенин и, синтезированный нами, бутеин. К сожалению, отсутствует тенаксин II.

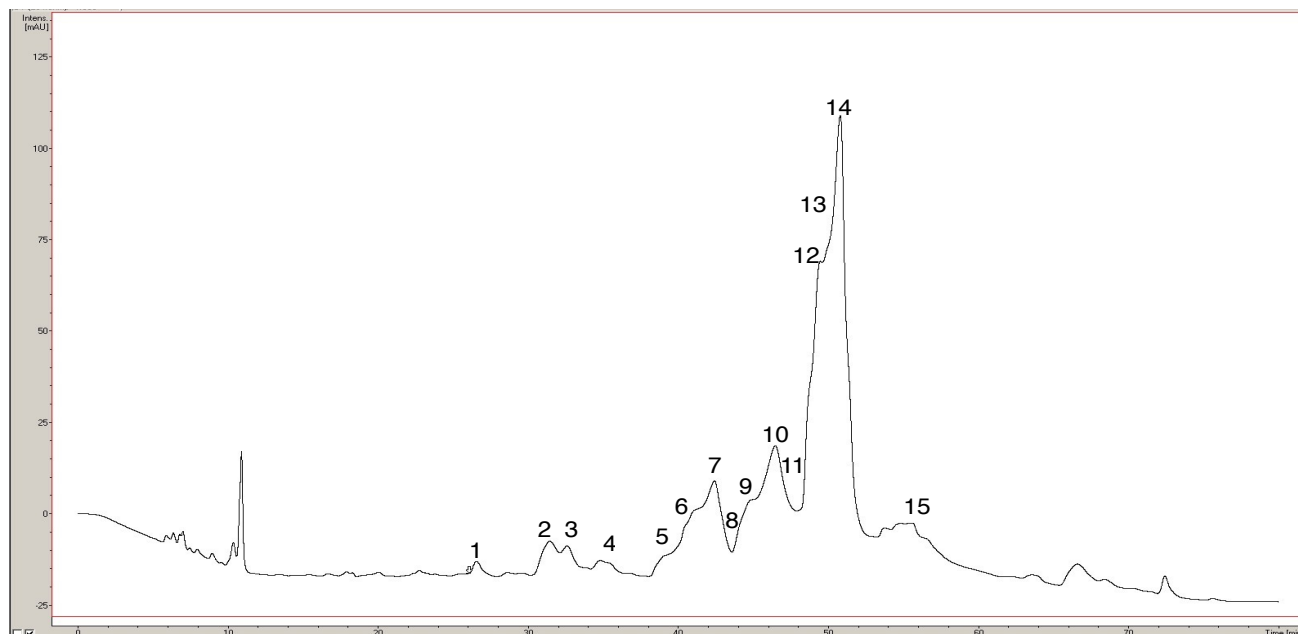


Рисунок 1 – ВЭЖХ-хроматограмма спиртового извлечения космеи дваждыперистой

Таблица 2 – Определение качественного состава спиртового извлечения космеи

Время удерживания	m/z прекурсор	MS ² -фрагменты	Соединение	Примечание
26,5	353	191, 179, 135	хлорогеновая кислота (1)	СО
31,3	707	353	димер кофеилхинной кислоты (2)	
32,1	353	191, 179	неохлорогеновая кислота (3)	
35,0	433	279, 135, 253	кареопсин (4)	
38,6	609	301, 273, 343, 255, 179	рутин (5)	СО
38,8	707	609, 513, 301	производное рутина (6)	
42,5	463	301, 179	кверцетин-О-гексозид (7)	

43,6	463	301, 179, 271, 343	кверцетин-гексозид (8)	
45,0	477	301, 179	нелумбозид (кверцетин-3-глюкуронид) (9)	
46,6	433	271, 301	кверцетин-О-пентозид (10)	
46,8	461	285, 199, 151	Лютеолин-О-глюкуронид (11)	
50,0	445	269, 175	апигенин-7-О-глюкуронид (12)	
51,5	475	299, 175	тенаксин II-7-О-глюкуронид (13)	
52,2	515	353, 191, 173	дикофеилхинная кислота (14)	
55,8	271	135, 153	бутеин (15)	СО

В кислотном гидролизате после нейтрализации хроматографически обнаружены моносахариды - глюкоза, рамноза, арабиноза и галактоза.

Хотя бутеин не является доминирующим представителем класса флавоноидов в цветках *Cosmos bipinnatus Cav.*, однако он может служить маркерным соединением для растений, содержащих данный халкон, и используемых в качестве антибактериального сырья. Доказательство его наличия в растении повышает достоверность идентификации сырья, особенно в смесях (сборах) и готовых лекарственных формах. Именно подобное рассуждение явилось основанием для синтеза данного халкона из 3,4-дигидроксибензальдегида и 2,4-дигидроксиацетофенона.

Идентификация полученной субстанции бутеина осуществлена при помощи УФ-, ИК- и масс-спектро스코пии и на ее основе согласно государственной фармакопее получен стандартный образец, который далее использовали для количественного определения этого соединения в сырье.

Определение проводили на хроматографе «Стайер» в изократическом режиме с УФ детектором при длине волны 385 нм (максимум бутеина в указанных условиях). Подвижная фаза ацетонитрил – 0,05 М фосфорная кислота (2:8), скорость потока 1 мл/мин, колонка 25 × 0,46 см, 5 мкм, Luna C18 Phenomenex объем вводимой пробы 20 мкл.

Хроматографировали стандартный и испытуемый растворы.

Порядок выхода веществ на хроматограмме стандартного раствора:

1. протокатеховый альдегид ($t=28,64$ мин, исходное вещество для синтеза, его содержание в стандартном образце в виде примеси 0,38%), резецетифенон ($t=66,4$ мин, исходный продукт синтеза, содержание примеси в стандартном образце не обнаружено);
2. бутеин ($t=160,07$ мин, основной продукт синтеза, его содержание в стандартном образце 99,62%) (рисунки 2, 3).

Идентификацию бутеина проводили по времени удерживания, которое на хроматограмме испытуемого раствора составляет 160,70 мин, на хроматограмме стандартного раствора – 160,07 мин.

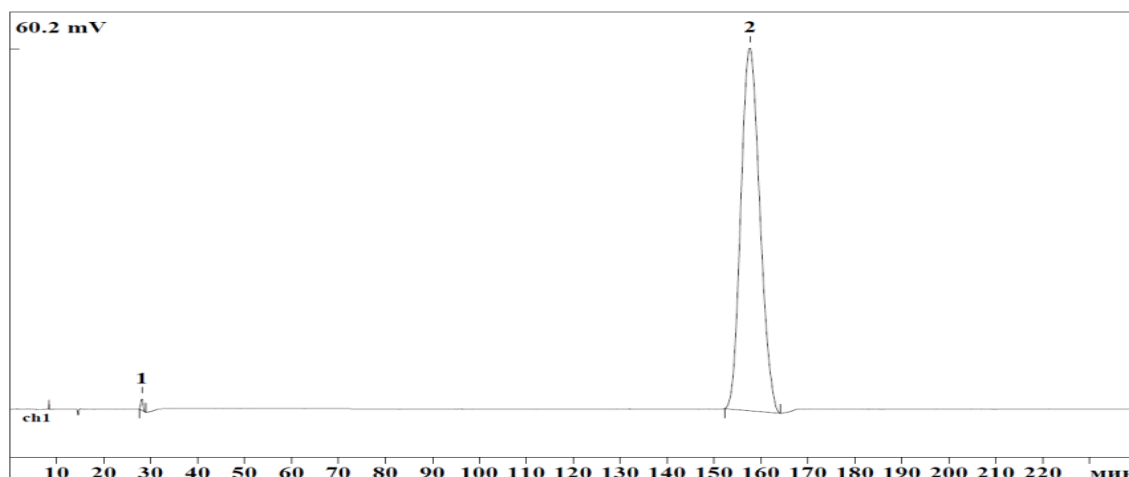


Рисунок 2 – Хроматограмма стандартного образца бутеина

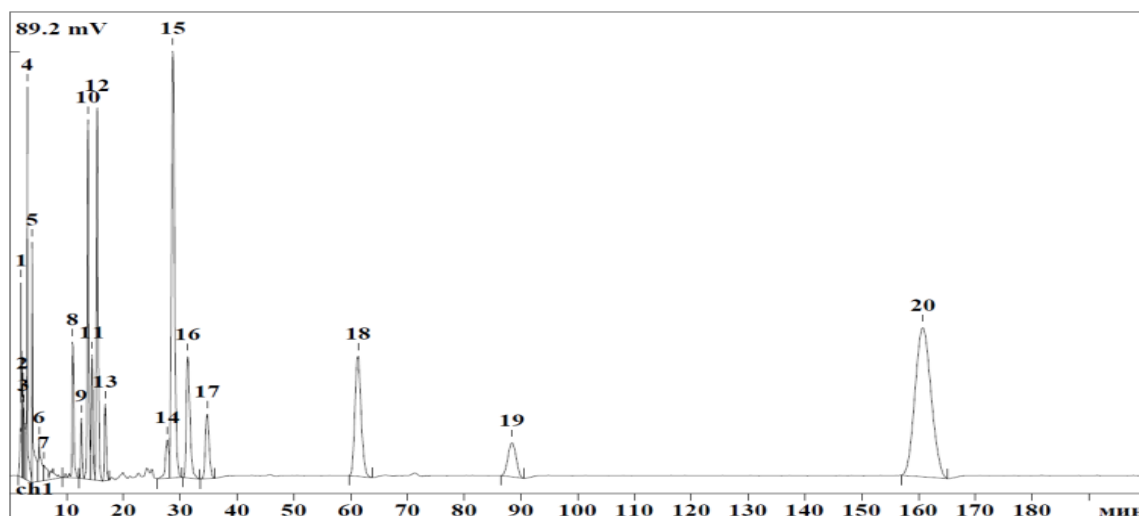


Рисунок 3 – Хроматограмма испытуемого раствора

Таким образом, содержание битеина в пересчете на сухое сырье составляет 0,043%.

Глава 5. Биологическая активность суммарных субстанций, полученных из космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus* Cav.)

Извлечения, полученные из космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus* Cav.) экстракцией сырья 70%-ным спиртом этиловым, обладают выраженным антиоксидантным, противовоспалительным и гиполипидемическим, антимикробным и противогрибковым действиями:

- спиртовые извлечения, полученные из космеи дваждыперистой, способствуют снижению накопления перекисных соединений и содержания малонового диальдегида на 24-54%;
- исследуемые извлечения космеи дваждыперистой снижают стадию экссудации на 40-52% и повышают пролиферативную фазу воспаления;
- исследуемые извлечения снижают содержание холестерина в сыворотке крови на 44-50%; уровня триглицеридов крови на 52-57%, а снижение ЛПНП в сыворотке крови составляет 15-28%;
- спиртовые и водные извлечения способны подавлять рост и размножение тест-штаммов и ингибировать жизнеспособность микроорганизмов на 85% (при максимальных концентрациях) - 40% (при минимальных концентрациях);
- извлечения из космеи дваждыперистой характеризуются антифунгальной активностью, превышающей действие препарата сравнения - нистатин и подавляют рост на 61-75%.

ОБЩЕЕ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Изучены качественный и количественный состав биологически активных соединений космеи дваждыперистой, которые представлены органическими кислотами, флавоноидами, аминокислотами, иридоидами, антоцианами и катехинами.

2. Количественное содержание:

- органических кислот в сырье составляет: в соцветиях сорта «Purity» $5,73 \pm 0,0533\%$, в его траве – $3,79 \pm 0,061\%$, в соцветиях сорта «Rosea» $4,69 \pm 0,0375\%$, в траве – $4,9 \pm 0,0624\%$, в соцветиях сорта «Dazzler» $3,3 \pm 0,0538\%$, в траве – «Dazzler» $2,6 \pm 0,0666\%$;

- флавоноидов в 70%-ных спиртовых извлечениях соцветий разных сортов в пересчете на лютеолин составляет: сорт «Purity» $2,81 \pm 0,0554\%$, сорт «Rosea» $1,39 \pm 0,0195\%$, сорт «Dazzler» $1,09 \pm 0,0139\%$;

- антиоксидантов в сырье в пересчете на кверцетин равно: в соцветиях и траве сорта «Purity» - $3,171 \pm 0,006\%$ и $2,58 \pm 0,004\%$, в соцветиях и траве сорта «Rosea» - $2,273 \pm 0,004\%$ и $0,819 \pm 0,008\%$, в соцветиях и траве сорта «Dazzler» - $2,106 \pm 0,005\%$ и $1,814 \pm 0,005\%$;

- суммы антоцианов в соцветиях и траве сорта «Rosea» - $0,32 \pm 0,0076\%$ и $0,17 \pm 0,0053\%$, в соцветиях и траве сорта «Dazzler» - $0,4 \pm 0,0082\%$ и $0,13 \pm 0,0056\%$;

- антоцианы содержатся только в окрашенных сортах космеи дваждыперистой («Rosea», «Dazzler»), а сорт «Purity» с белыми краевыми цветками антоцианов не содержит;

- аминокислотный состав всех сортов примерно одинаков, однако глутаминовая кислота обнаружена только в сорте «Dazzler», а аспарагиновая кислота - в «Rosea»; для всех сортов характерно наличие значительного количества пролина (в среднем $85,1\%$ от суммы всех аминокислот);

- наибольшее содержание фенольных в пересчете на галловую кислоту установлено в соцветиях сорта «Purity» (экстрагент 95%-ный спирт этиловый) $2,786 \pm 0,0047$.

3. Из травы трех сортов космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus Cav.*) выделены пектиновые вещества с выходом от 4 до 8%, поэтому данное растение можно рассматривать как источник для получения пектиновых

веществ (ПВ):

- наибольшей сорбционной активностью по отношению к ионам Pb^{2+} и наименьшим коэффициентом распределения обладают ПВ космеи сорта «Rosea», что можно рекомендовать для практического применения в качестве природных сорбентов тяжелых металлов;

- установлено, что ПВ способны связывать ионы свинца и при этом процент связывания зависит от пектинов конкретного сорта: он находится в пределах от 70 до 82,5% и это позволяет сделать вывод о возможности использования ПВ и ВРПС, полученных из сортов «Purity» и «Dazzler» для экстракции ионов свинца (II) из разных объектов, а также в качестве природных детоксикантов.

4. С использованием обращенно-фазового варианта ВЭЖХ в сочетании с УФ- и масс-детекцией в извлечениях, полученных экстракцией сырья 70%-ным этанолом, установлено наличие 15 соединений полифенольной природы, в том числе 3-х фенолокислот (хлорогеновой, димера кофейилхинной кислоты и неохлорогеновой), халкона бутеина и его 4'-глюкозида (кареопсина), а также 10 производных флавонола. Идентификацию отдельных соединений осуществляли при помощи стандартных образцов, а также с использованием данных библиотеки масс-спектров NIST 18 и литературы:

- установлено, что агликонами флавоноидов являются кверцетин, лютеолин, апигенин и тенаксин II, что подтверждает результаты обращенно-фазового варианта ВЭЖХ в сочетании с УФ- и масс-детекторами.

5. Предложена методика количественного определения бутеина в сырье с использованием твердофазной экстракции;

6. Извлечения, полученные экстракцией сырья 70%-ным спиртом этиловым, обладают выраженным антиоксидантным,

противовоспалительным и гиполипидемическим, антимикробным и противогрибковым действиями:

- спиртовые извлечения способствуют снижению содержания перекисных соединений и малонового диальдегида на 24-54%; процесса экссудации на 40-52% и повышению пролиферативной фазы воспаления; снижению холестерина в сыворотке крови на 44-50%, триглицеридов крови на 52-57%, ЛПНП в сыворотке крови на 15-28%; ингибированию жизнеспособности микроорганизмов в среднем на 40-85%; подавлению роста грибов в среднем на 61-75%.

7. Получена суммарная субстанция полифенолов из космеи дваждыперистой – *Cosmos bipinnatus* Cav. с целью их последующего фармакологического изучения.

Научно-практические рекомендации

Результаты, полученные в ходе выполнения диссертации позволяют рекомендовать сырье космеи дваждыперистой для дальнейшего более детального химического исследования, основанного на препаративном выделении отдельных биологически активных соединений, а также фармакологического изучения.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Проведенные исследования свидетельствуют о перспективности дальнейшего изучения космеи дваждыперистой как источника новых фармакологических средств, характеризующихся антиоксидантным, противовоспалительным, гиполипидемическим, антибактериальным и противогрибковым видами активности.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Распределение пектиносодержащих веществ, полученных из космеи дваждыперистой, между двумя жидкими фазами / Е. О. Куличенко [и др.] // Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. – 2020. – № 3(29). – С. 27-35.
2. Изучение адсорбционных и кинетических характеристик природных сорбентов по отношению к катионам свинца (II) / Е. О. Куличенко [и др.] // Химия растительного сырья. – 2019. – № 3. – С. 335-344.
3. Физико-химическое исследование пектиновых веществ из травы космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus Cav.*) / Е. О. Куличенко, Л. П. Мыкоц, Н. А. Туховская [и др.] // Международный научно-исследовательский журнал. – 2021. – № 11-2(113). – С. 207-215.
4. Фармакологическая активность извлечений растений вида *Cosmos bipinnatus Cav.* / Е. О. Куличенко [и др.] // Фармация и фармакология. – 2022. – Т. 10. – № 1. – С. 82-92.
5. Куличенко, Е. О. Морфолого-анатомическое изучение космеи дваждыперистой / Е. О. Куличенко, С. П. Лукашук, Э. Т. Оганесян // Евразийский союз ученых. – 2017. – № 10-1(43). – С. 72-74.
6. Оценка параметров адсорбционного слоя, образованного растительным биополимером в водной среде / Е. О. Куличенко, Л. П. Мыкоц, Э. Т. Оганесян, О. А. Андреева // О некоторых вопросах и проблемах современной медицины : сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции. – Челябинск, 2017. – С. 42-46.
7. Куличенко, Е. О. О химическом составе *Cosmos bipinnatus Cav.* и биологической активности отдельных ее компонентов / Е. О. Куличенко, А. М. Темирбулатова // Наука: комплексные проблемы. – 2020. – № 1(15). – С. 8-19.
8. Куличенко, Е. О. Исследование влияния экстрактов космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus Cav.*) на ЛПНП и ЛПВП сыворотки крови крыс / Е. О. Куличенко // Наука: комплексные проблемы. – 2021. – № S2(18). – С. 16.
9. Куличенко, Е. О. Определение антиоксидантной активности извлечений из космеи дваждыперистой (*Cosmos bipinnatus Cav.*) / Е. О. Куличенко // Научные исследования как основа инновационного развития общества: сборник статей международной научно-практической конференции. – Омск, 2021. – С. 277-283.
10. Утяганова, Е. В. Исследование антибактериальной активности извлечений из *Cosmos bipinnatus Cav.* в отношении некоторых представителей условно-патогенной флоры / Е. В. Утяганова, Е. О. Куличенко, Х. М. Бекбузарова // Современная химия - основа устойчивого развития : сборник материалов III международной научно-практической конференции. – Астрахань, 2021. – С. 91-92.
11. Утяганова, Е. В. Исследование фунгицидной активности извлечений из *Cosmos bipinnatus Cav.* в отношении некоторых представителей микромицетов / Е. В. Утяганова, Е. О. Куличенко, Ф. И. Ахаева // Современная химия - основа устойчивого развития : сборник материалов III международной научно-практической конференции. – Астрахань, 2021. – С. 111-112.