

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я
НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ
О.О.БОГОМОЛЬЦЯ
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
ХІМІЇ ЛІКІВ ТА ЛІКАРСЬКОЇ ТОКСИКОЛОГІЇ
(назва кафедри)

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Дослідження токсикантів у складі рослинної сировини Хвощу лісового (*Equisetum sylvaticum*) методом газової хроматографії»

Виконав: здобувач вищої освіти 5 курсу, групи Ф1А
напряму підготовки (спеціальності)
226 «Фармація, промислова фармація»
(шифр і назва напряму підготовки, спеціальності)

Фармацевтичний факультет, заочна форма навчання
Освітньо-кваліфікаційний рівень «магістр»
«Фармація»
(назва освітньої програми)

Кумановська Яна Олександрівна
(прізвище та ініціали)

Керівник: ас. Мелешко Р.А.
(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент: проф., д.фарм.н. Вельчинська О.В.
(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Київ – 2025-2026 р.р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	3
ВСТУП.....	5
ОСНОВНА ЧАСТИНА.....	10
 РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ОТРУЙНИХ РЕЧОВИН.....	10
1.1. Особливості хімічної будови	10
1.2. Біологічна активність	16
 РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ОТРУЙНИХ РЕЧОВИН.....	18
2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості	18
 РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА.....	26
 ВИСНОВКИ.....	36
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	37
SUMMARY	41
ДОДАТОК 1.....	42

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

г – грам

ГМДС – гексаметилдисилоксан

ГРХ – газо-рідинна хроматографія

ДФУ – Державна Фармакопея України

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – диметилформамід

ІЧ спектр – інфрачервоний спектр

мкл – мікролітр

мкм – мікромметр

мл – мілілітр

ММ – молекулярна маса

НРФ – нерухома рідка фаза

нм – наномметр

РХ – рідинна хроматографія

см⁻¹ – обернений сантиметр

Спектр ПМР – спектр протонно-магнітного резонансу

ТМС – тетраметилсілан

ТГФ – тетрагідрофуран

T. кип. – температура кипіння

T. пл. – температура плавлення

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

ЯМР ^1H – спектр ядерно-магнітного резонансу протонний

Alk – алкіл-радикал

Ar – арил-радикал

°C – градуси Цельсія

Hal – галоген

J, Гц – значення константи спин-спінової взаємодії, герци

MOR – μ -opioid receptor

ВСТУП

Актуальність теми. Хвощ лісовий (*Equisetum sylvaticum*) — багаторічна рослина родини хвощевих, що вирізняється появою спороносних (буруватих, нерозгалужених) та вегетативних (зелених, дуже розгалужених) пагонів, які розвиваються з одного кореневища. Рослина має характерні членисті стебла та розгалуження, схожі на соснові гілки. Використовується в народній медицині як сечогінний, протизапальний та кровоспинний засіб, потребує обережності через потенційну отруйність.

Рослина містить фермент тіаміназу, який руйнує вітамін В1. Тривале вживання може викликати гіповітаміноз, містить слідові кількості нікотину; вона є потенційно отруйною, особливо для худоби, вимагає обережного застосування. Хвощ лісовий (*Equisetum sylvaticum*) не належить до офіційних лікарських рослин і не рекомендується для використання в лікувальних цілях.

Аналіз рослинної сировини хвощ лісової (*Equisetum sylvaticum*) проводиться з використанням комплексу фармакогностичних, хімічних та фізико-хімічних методів для підтвердження його справжності.

Хвощ лісовий не є фармакопейною рослиною, на відміну від хвоща польового, але методи його дослідження з науковою метою аналогічні.

Основні методи аналізу:

- Макроскопічний та мікроскопічний аналіз: Візуальна оцінка зовнішніх ознак (форма та розгалуження, колір, наявність спороносних колосків) та вивчення анатомічних особливостей під мікроскопом на відміну від інших, більш токсичних видів (хвощ болотного *Equisetum palustre*).

- Хімічний аналіз. Визначення фенольних сполук (флавоноїдів та фенолокислот): якісний склад вивчають за допомогою тонкошарової хроматографії (ТСХ). Кількісне визначення часто проводять спектрофотометричним методом.

Визначення алкалоїдів: аналізи на наявність палюстрину та інших потенційно токсичних алкалоїдів.

Елементний аналіз: вмісту мікро- та макроелементів (кремнію) з використанням методів - нейтронно-активаційний або рентгенофлуоресцентний.

Хвощ лісовий (*Equisetum sylvaticum*) в основному не використовується в офіційній чи народній медицині різних країн через його потенційну токсичність. Практично всі лікувальні властивості та застосування, які приписують "хвощу" у медичних практиках по всьому світу, належать до хвоща польового (*Equisetum arvense*).

Хвощі лісовий та польовий плутають. Види хвоща дуже схожі, їх важко розрізнити без спеціальних ботанічних знань.

Локальне народне застосування описано: у деяких дуже специфічних та локальних традиційних практиках, переважно в Європі та Північній Америці, *іноді Equisetum sylvaticum* міг використовуватися як сечогінний або в'яжучий засіб, але це застосування рідкісне, не стандартизоване і не підтримується офіційною медициною через ризики.

Таким чином, Хвощ лісовий не є визнаною лікарською рослиною в жодній з основних світових медичних практик. Використання хвоща в медицині завжди має на увазі хвощ польовий (*Equisetum arvense*).

Екологічна безпека лісової флори є фундаментальним критерієм, за яким рослини використовують у медичної екології. Вона потребує підвищення контролю якості рослин в умовах глобальної екологічної кризи.

Дослідження екологічних ризиків у регіонах із високим рівнем біологічного різноманіття та значними ресурсами флори – на території Волинського Полісся є важливими.

Унікальні флористичні особливості регіону роблять його ключовим центром заготівлі лікарської рослинної сировини та центром наукових досліджень, *особливо, хіміко-токсикологічних*. Техногенні забруднення та екологічні наслідки, викликають серйозні наукові та практичні занепокоєння щодо забруднення в регіоні.

Забруднення отрутохімікатами, важкими металами, пестицидами або токсичними продуктами техногенного походження знижує лікувальний потенціал рослинних препаратів, чистоту рослинного світу та може становити загрозу здоров'ю людини, провокуючи різні патологічні стани.

Враховуючи зростаючі загрози здоров'я населення вивчення екологічної безпеки лісової флори Волинського Полісся є не лише актуальним, а й стратегічно важливим завданням сучасної науки [1-5].

Детонація боєприпасів викликає забруднення ґрунту та води важкими металами (свинець, ртуть, кадмій, мідь), органічними токсичними сполуками. Забруднені території можуть накопичувати радіонукліди, що посилює ризики для екологічної стабільності регіону.

За даними ВООЗ, приблизно 80% населення світу використовує лікарські засоби рослинного походження в медичній практиці. Це робить безпеку фітотерапії глобальним пріоритетом охорони здоров'я [2-10].

Актуальність вибору для дослідження базується на хіміко-токсикологічному аналізі рослини Волинського Полісся Хвощу лісового, яка не відноситься до офіційних фармакопейних, у порівнянні із деякими фармакопейними рослинами з тих же самих територій, наприклад, рослиною Чебрець Повзучий *на вміст ксенобіотиків методом ГХ*, з територій, які підлягають постійному забрудненню, в тому числі, й в результаті вибухів бойових отруйних речовин.

Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження є хіміко-токсикологічний аналіз рослинної сировини Хвощу лісового (територія походження Західна Україна, Волинське Полісся) на вміст ксенобіотиків методом Газової Хроматографії (ГХ), адаптація умов хроматографування випробовуваних об'єктів для розуміння ступеню забруднення територій токсикантами.

Завдання експериментального дослідження:

- Адаптувати методики пробопідготовки та досліджень, умови хроматографічного досліджень випробовуваних об'єктів рослинного походження - Хвощ лісовий (*Equisetum sylvaticum*).
- За допомогою методу Газової Хроматографії дослідити чистоту випробовуваних об'єктів на присутність токсикантів – пестицидів, хлор- та фосфорвмісних речовин.
- Провести аналіз вмісту токсикантів у випробовуваних об'єктах відповідно до допустимого нормування та інтерпретувати результати.

Методи дослідження. Газова хроматографія на хроматографі Agilent 6890A з електронезахоплювальним детектором, колонка – HP-1 (100 % полідиметилсилоксан), 30 м × 0,32 мм × 0,25 мкм; колонка була підключена до переднього електронезахоплювального детектора (ECD); комп'ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS.

Новизна та значення одержаних результатів. Новизна експериментального дослідження полягає у осучасненні хіміко-токсикологічного аналізу шляхом впровадження високоселективного хроматографічного методу ГХ для ідентифікації і кількісного визначення токсикантів як очікуваних в результаті хімічного забруднення, антропогенного впливу та воєнних дій складових об'єктів рослинного походження Волинського Полісся.

Апробація результатів дослідження. Результат досліджень апробовано на міжнародній науково-практичній конференції

Публікації: За матеріалами дослідження подані до публікації 1 тези доповіді.

Структура роботи: загальну кількість сторінок – 42, кількість розділів – 3, кількість додатків – 1, кількість використаних джерел – 28.

ОСНОВНА ЧАСТИНА

РОЗДІЛ 1. ОСОБЛИВОСТІ ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ ОТРУЙНИХ РЕЧОВИН

1.1. Особливості хімічної будови

Досліджено структуру апікальної меристеми пагона (АВП), ультраструктуру клітин та походження зачатків органів у АВП хвощів польових *Equisetum sylvaticum* L. та *E. fluviatile* L.

Виявлено низький ступінь вакуолізації та структурну однорідність клітин. Вони складають зону поверхневих ініціалів, наявність окремих крохмальних зерен у пластидах та окремих ліпідних крапель у цитоплазмі клітин. Ці особливості схожі на такі в моноплексній АВП лікофітів, ніж в лептоспорангієвих папоротях. Ініціація листя у *E. sylvaticum* та *E. fluviatile* шляхом появи апікальних ініціалів листка у зоні поверхневих ініціалів подібна до рослин з моноплексною АВП - папоротей, лікофітів.

Головною особливістю органогенезу у хвощів є походження листової мутовки - єдиної структури. Кожна мутовка розвивається з триплету апікальних початкових мерофітів пагона. Внутрішні клітини листової мутовки належать до єдиного триплету мерофітів, диференціюються в інтеркалярну меристему. Кожен фітомер *E. sylvaticum* та *E. fluviatile* складається з мутовки зрощених листків та мутовки бруньок. Вони виникають у пазухах основ листків, розташованих між листками і чергуються з листям. Кожна брунька несе один кореневий зачаток. Зачатки бруньок розвиваються на надземних пагонах, а кореневі зачатки – на підземних пагонах.

Припинення функціонування верхівкової меристеми листка призводить до відсутності крайової меристеми та судинних тканин у листовій пластинці. Проксимодистальний розвиток листової мутовки та походження бруньок зумовлені меристемою периферичної частини інтеркалярної меристеми.

Пошук гомологів генів, що кодують у покритонасінних рослин регулятори розвитку адаксіального (C3HDZ та ARP) та абаксіального (YABBY та KANADI) доменів листя у доступних транскриптомах хвощів польових. Зіставлення знайдених гомологів з геномами мохів, папоротей та голонасінних рослин проведено в контексті оцінки ймовірної регуляторної подібності або відмінності листя хвощів у контексті гомології листя у двох групах.

MEME-аналіз показав, що білки R2-R3 MYB з транскриптомів хвощів польових не є гомологами ARP. Було виявлено, що хвощ польовий має один адаксіальний регулятор домену (C3HDZ), один абаксіальний регулятор домену (KANADI). Відкриття свідчить про ймовірну втрату інших регуляторів адаксіального (ARP) та абаксіального (YABBY) доменів у спільного предка *Polypodiophyta*.

Філогенетичний аналіз ідентифікованих гомологів генів, що кодують білки WOX, свідчить, що клада T3, яка включає регулятори крайових (WOX3) та пластинчастих (WOX1) меристем листя, виникла від предка *Polypodiophyta*. Це вказує на подібність у молекулярно-генетичній регуляції листя хвощів та інших папоротей [10-17].

Виділені із сировини хвоща кемпфероли та кверцетин. Найбільш вивченим класом сполук рослин роду хвощу є флавоноїди. Наразі досліджено флавоноїди 13 видів рослин роду *Equisetum* L., з яких виділено та ідентифіковано 72 речовини.

Флавоноїди, що продукуються рослинами роду *Equisetum*, представлені: флавонами, флавонолами, флаванонами та флаван-3-олами. З чотирьох видів роду *Equisetum* (*E. arvense*, *E. fluviatile*, *E. hyemale*, *E. litorale*) виділено 19 похідних флавона, п'ять є агліконами, глікозидами апігеніну, ганкваніну і лютеоліну. Флавоноли є домінантною групою серед флавоноїдів рослин роду *Equisetum*. Виділено 48 флавонолів, 4 з яких є агліконами. Інші з'єднання представлені глікозидами та ацилглікозидами кемпферолу, кверцетину,

гербацетину (3,5,7,8,4'-пентагідроксифлавону) та держипетину (3,5,7,8,3',4'-гексагідроксифлавону) (рис. 1.1.1).

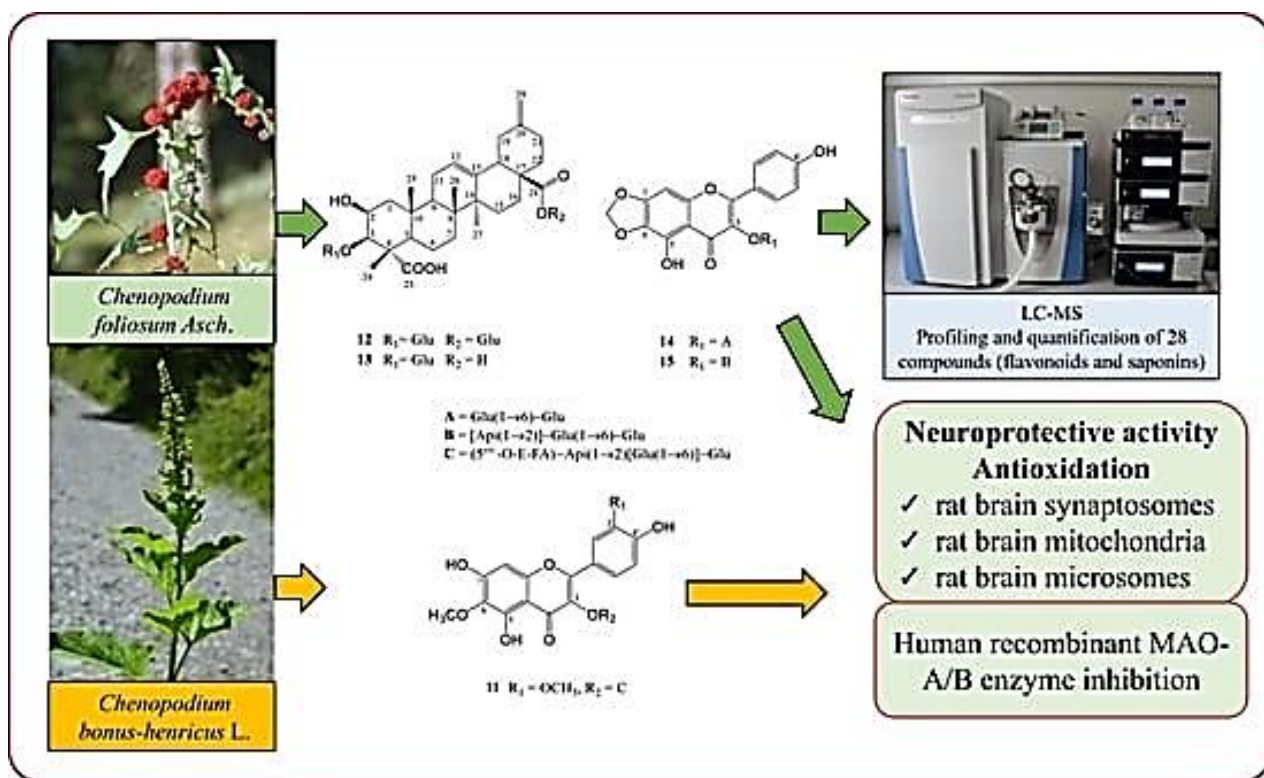


Рисунок 1.1.1. Флавоноїди.

Рід *Chenopodium* (Amaranthaceae) включає понад 200 видів і зустрічається на всіх континентах. У болгарській народній медицині коріння *C. bonus-henricus* використовується для лікування різних захворювань, включаючи бронхіт, ларингіт, ревматизм, подагру, запор та дерматит.

З надземної частини *C. bonus-henricus* виділено дев'ять флавоноїдів, зокрема глікозиди патулетину, 6-метоксикемпферолу та спінацетину. З коренів тієї ж рослини екстраговано шість сапонінів - фітолакагенін, 2 β -гідроксиолеанову кислоту, байогенін, 2 β -гідроксигіпсогенін та медикагенову кислоту. Сполуки продемонстрували гепатопротекторну та антиоксидантну активність, порівнянну з активністю силібініну/силімарину, в моделях пошкодження печінки, індукованого чотирьохлористим вуглецем (CCl₄).

Ці сполуки продемонстрували значний нейропротекторний вплив на ізольовані синаптосоми мозку щурів, використовуючи модель 6-

гідроксидопаміну, в моделі оксидативного стресу, індукованого перекисом водню (H_2O_2), на клітинах нейробластоми людини SH-SY5Y.

Ізольовані флавоноїди та сапоніни проявляли анти- α -глюкозидазну та проліпазну активність. Флавоноїди продемонстрували активність поглинання радикалів DPPH та ABTS. Вони значно пригнічували перекисне окислення ліпідів у системі лінолевої кислоти методом тіоціаната заліза. Протестовані сапоніни продемонстрували помірну або граничну цитотоксичність на п'яти лейкомічних клітинних лініях (HL-60, SKW-3, Jurkat E6-1, BV-173 та K-562). Вони посилювали вироблення інтерлейкіну-2 у клітинах Jurkat E6-1, стимульованих РНА/РМА.

Chenopodium foliosum Asch. (Amaranthaceae) – однорічна трав'яниста рослина, поширена по всій Європі. У болгарській народній медицині рослина також відома як «часник» або «свинські ягоди» (свинячі ягоди). Відвар її надземної частини використовувався для лікування раку, а також як імуностимулятор та антиоксидантний препарат.

Фітохімічне дослідження надземної частини рослини призвело до виділення шести флавонольних глікозидів - патулетин, 6-метоксикемпферол, спінацетин та гомфренол. Було ідентифіковано чотири глікозиди 30-нормедикагенової кислоти зі стимулюючим впливом на вироблення інтерлейкіну-2. Деякі з флавоноїдів виявляли гепатопротекторну активність *in vitro* на моделі пошкодження печінки та продемонстрували антиоксидантну активність [17-22].

Моноаміноксидаза – це флавін-аденін-динуклеотид-залежний фермент, розташований на зовнішній мембрані мітохондрій. Дві ізоформи MAO: MAO-A та MAO-B. MAO-A і MAO-B відіграють роль у регуляції аміних нейромедіаторів, включаючи дофамін.

MAO-A відповідає за метаболізм ДА у пресинаптичних нейронах. MAO-B метаболізує ДА, який вивільняється в синаптичну щілину та поглинається гліальними клітинами. Кількість гліальних клітин має тенденцію до

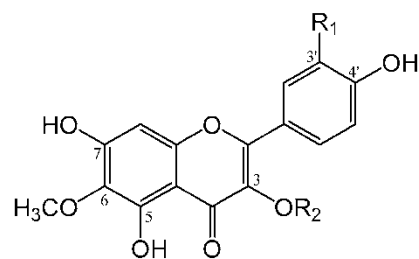
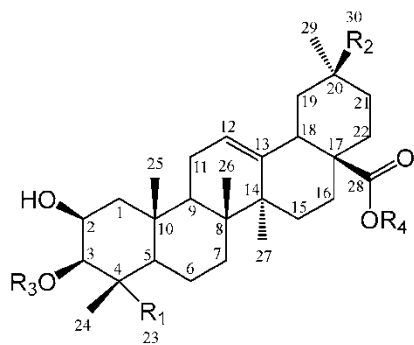
збільшення з віком та при нейродегенеративних захворюваннях. Активність MAO-B зростає. Інгібітори моноаміноксидази А (MAO-A) та моноаміноксидази В (MAO-B) використовуються для лікування психічних та нейродегенеративних захворювань відповідно.

Інгібітори MAO-B підвищують рівень дофаміну в мозку людей з хворобою Паркінсона, у випадках часткового виснаження нейронів, що продукують дофамін, забезпечуючи протипаркінсонічний ефект. Інгібітори MAO-A переважно використовуються як антидепресанти.

Хвороба Паркінсона є другим за поширеністю нейродегенеративним захворюванням після хвороби Альцгеймера. Хвороба Паркінсона характеризується аномальним утворенням нейритів Леві та тілець Леві. Вони складаються з внутрішньонейронних білкових агрегатів, головним чином α -синуклеїну. Ці агрегати поширюються висхідним шляхом від довгастого мозку до покривки мосту, середнього мозку, мезокортексу та неокортексу. Спостерігається зменшення кількості дофамінергічних нейронів у чорній субстанції. Це призводить до дефіциту дофаміну.

Найпоширенішими руховими симптомами є брадикінезія, тремор спокою, ригідність, порушення ходи. Ці симптоми супроводжуються немоторними симптомами - порушення сну, депресію та втому. При хворобі Паркінсона надмірне вироблення активних форм кисню (АФК) посилюється факторами - нейрозапалення, мітохондріальна дисфункція, старіння та підвищений рівень заліза та кальцію, а також деградація дофаміну. Підвищується рівень малонового діальдегіду, маркера процесу перекисного окислення ліпідів.

Досліджено активні сполуки в різних субклітинних фракціях мозку щурів - синаптосоми, мітохондрії та мікросоми. Розробили та валідували метод UHPLC-HRMS для кількісного визначення флавоноїдів та сапонінів, присутніх у надземній частині *S. Foliosum* (рис. 1.1.2, 1.1.3).

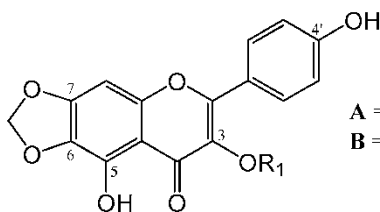
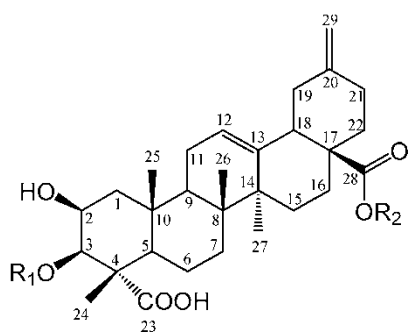


A = Glu(1→6)–Glu
B = [Api(1→2)]–Glu(1→6)–Glu
C = (5'''-O-E-FA)–Api(1→2)[Glu(1→6)]–Glu

- | | | | | |
|----------|------------------------------|------------------------|---------------------|---|
| 1 | $R_1 = \text{COOH}$ | $R_2 = \text{CH}_3$ | $R_3 = \text{GluA}$ | $R_4 = \text{Xyl}(1 \rightarrow 4)\text{Rham}(1 \rightarrow 2)\text{Ara}$ |
| 2 | $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ | $R_2 = \text{COOCH}_3$ | $R_3 = \text{Ara}$ | $R_4 = \text{Glu}$ |
| 3 | $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ | $R_2 = \text{CH}_3$ | $R_3 = \text{GluA}$ | $R_4 = \text{Glu}$ |
| 4 | $R_1 = \text{CH}_2\text{OH}$ | $R_2 = \text{CH}_3$ | $R_3 = \text{Ara}$ | $R_4 = \text{Glu}$ |
| 5 | $R_1 = \text{CHO}$ | $R_2 = \text{CH}_3$ | $R_3 = \text{GluA}$ | $R_4 = \text{Glu}$ |
| 6 | $R_1 = \text{CH}_3$ | $R_2 = \text{CH}_3$ | $R_3 = \text{GluA}$ | $R_4 = \text{Glu}$ |

- | | |
|-----------|--------------------------------------|
| 7 | $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{A}$ |
| 8 | $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{B}$ |
| 9 | $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{A}$ |
| 10 | $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{C}$ |
| 11 | $R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{C}$ |

Рисунок 1.1.2. Структура флавоноїдів.



A = Glu(1→6)–Glu
B = (5'''-O-E-FA)–Api(1→2)[Glu(1→6)]–Glu

- | | | | | |
|-----------|--------------------|--------------------|-----------|------------------|
| 12 | $R_1 = \text{Glu}$ | $R_2 = \text{Glu}$ | 14 | $R_1 = \text{A}$ |
| 13 | $R_1 = \text{Glu}$ | $R_2 = \text{H}$ | 15 | $R_1 = \text{B}$ |

Рисунок 1.1.3. Структура сапонінів.

1.2. Біологічна активність

Вплив сполук на рекомбінантний фермент MAO-A/MAO-B людини. Сапоніни та флавоноїди з *C. bonus-henricus* та *C. foliosum* досліджені на потенційну інгібуючу активність MAOA та MAOB. Хлоргілін та селегілін були позитивними контролями у тестах hMAO-A та hMAO-B. Речовини та позитивні контролі застосовували у кінцевій концентрації 1 мкМ. При застосуванні у тестованій концентрації сполуки не виявляли статистично значущого інгібуючого ефекту на MAO-A/B. Триглікозид спінацетину та глікозиди 30-нормедикагенової кислоти і глікозиди гомфренолу продемонстрували слабкий, інгібуючий ефект на MAO-A та хороший інгібуючий ефект на MAO-B (чистий hMAO-A та чистий hMAO-B). Сполука інгібувала hMAO-A на 18%, сполука 12 – на 19%, а інші сполуки – на 20%.

Класичний інгібітор MAO-A хлоргілін знизив активність ферменту на 55% (чиста hMAOA). Флавоноїди знизили активність hMAO-B на 35% Сапоніни знизили її на 30%. Селегілін, класичний інгібітор MAO-B, знизив активність ферменту на 55%. Дослідили активні сполуки на нейропротекторну дію в різних субклітинних фракціях мозку щурів - синаптосоми, мітохондрії та мікросоми. Вплив сполук на ізольовані синаптосоми мозку щурів. Досліджено нейротоксичність сполук та позитивного контролю силібіну на біомаркери. Вони характеризують функціонально-метаболічний профіль синаптосом мозку. У відносно високій концентрації (100 мкМ) сполуки не виявляли статистично значущого нейротоксичного ефекту на ізольовані синаптосоми мозку щурів. Вони не змінюють основні параметри, що характеризують функціонально-метаболічний стан синаптосом – життєздатність синаптосом, визначену за допомогою МТТ-тесту, та рівень відновленого глутатіону (GSH). Обробка синаптосом 6-гідроксидофаміном (6-OHDA) є відомою моделлю *in vitro*. Вона імітує деякі симптоми хвороби Паркінсона. 6-OHDA має структурну схожість з дофаміном (DA) та

норадреналіном (NA), демонструє високу спорідненість до кількох катехоламінергічних транспортерів у плазматичній мембрані - транспортери дофаміну (DAT) та норадреналіну (NET).

Сполука може проникати в дофамінергічні та норадренергічні нейрони, пошкоджувати периферичну та центральну нервову системи. Потрапляючи всередину нейрона, 6-OHDA зберігається в грануляційних структурах. Може вивільнятися при нервовій стимуляції, діючи як нейромедіатор.

МАО (моноаміноксидаза) є важливим ферментом для метаболізму 6-OHDA. Фермент, зберігання в грануляційних структурах, може служити захисними механізмами. При високих концентраціях у цитоплазмі 6-OHDA генерує високореактивні продукти — перекиси, супероксиди та хінони. Продукти неспецифічно реагують з нейрональними структурами та пошкоджують нейрони [23-26]. У моделі нейротоксичності випробувані сполуки у концентрації 50 мкМ продемонстрували нейропротекторну та антиоксидантну активність порівняно з контролем (чистий 6-OHDA). Застосований окремо у концентрації 150 мкМ, токсичний агент (6-OHDA) знизив життєздатність синапсом та рівень GSH на 50% (необроблені синапсами). У поєднанні з 6-OHDA сполуки та силібін у концентрації 50 мкМ зберегли життєздатність синапсом та рівень GSH: сполуки зберегли життєздатність синапсом на 60%, інші сполуки — на 50%, а силібін — на 70%. Флавоноїди та силібін зберегли рівень GSH на 70%. Сапоніни зберегли цей параметр на 60% порівняно з контролем (чистий 6-OHDA). Найактивнішими були глікозиди спінацетину та гомфренолу. Це пов'язано з наявністю естерифікованої ферулової кислоти в їх складі, добре відома своїми антиоксидантними властивостями та здатністю поглинати активні форми кисню (ROS). Можливий механізм нейропротекторної активності в цій моделі нейротоксичності, найімовірніше, пов'язаний з пригніченням активності МАО-В та збереженням рівня відновленого глутатіону - нуклеофілу, що захоплює вільні радикали.

РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ОТРУЙНИХ РЕЧОВИН

2.1. Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості

Валідація методу. Для виявлення флавоноїдів та сапонінів у екстракті EtOH з надземної частини *Chenopodium foliosum* Asch. використовували UHPLC-HRMS (надвисокоєфективну рідинну хроматографію/мас-спектрометрію високої роздільної здатності).

Ефективність процедури екстракції та оптимізація хроматографічних умов відповідали літературним джерелам. Як розчинники використовували MeOH, EtOH та i-PrOH, їх суміші з водою. Найкращі результати були отримані з 70% EtOH.

Дві хроматографічні колонки - колонка Kromasil C18 (Bohus, Швеція) та колонка Kromasil Eternity XT C18 були протестовані для розділення флавоноїдів та сапонінів з досліджуваної рослини. Перша колонка показала найкращі результати, була обрана для розробки методу.

Кількісне визначення флавоноїдів та сапонінів у надземній частині *Chenopodium foliosum* Asch. проводили методом зовнішнього стандарту. Гіперозид та сапонін Chfs01 (3-O- β -глюкопіранозил-2 β ,3 β -дигідрокси-30-норолеан-12,20(29)-дієн-23,28-діоїнової кислоти 28-O- β -глюкопіранозилловий естер) обрані як стандарти для розрахунку кількості виявлених флавоноїдів та сапонінів відповідно. Розділення стандарту (рис. 2.1.1).

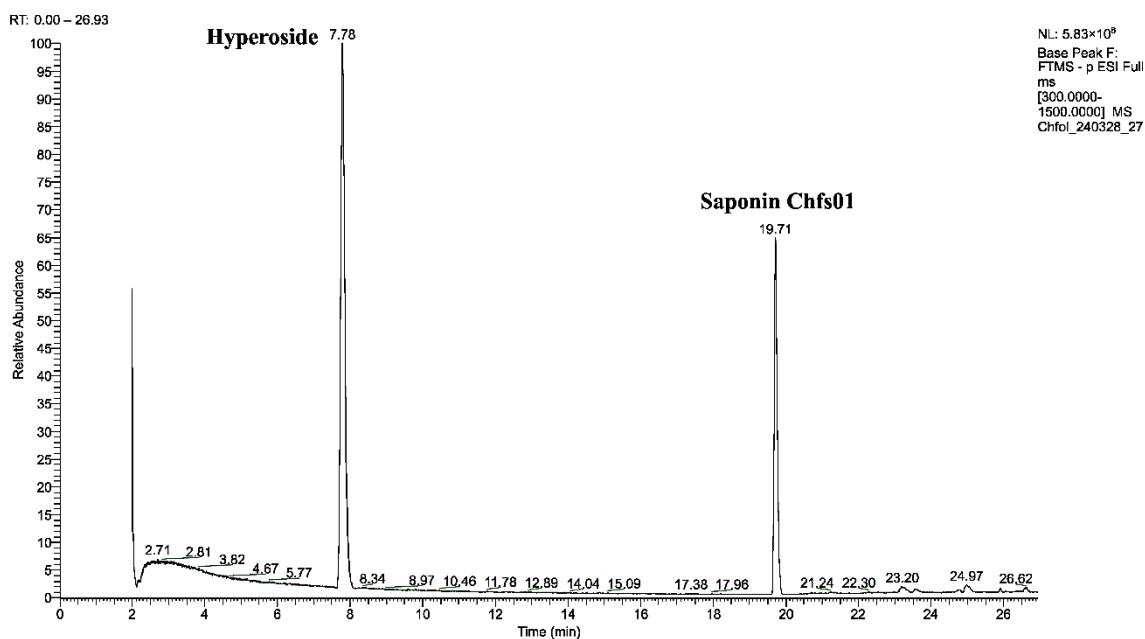


Рисунок 2.1.1. Хроматографічне розділення стандартів гіперозиду та сапоніну Chfs01 за допомогою UHPLC-HRMS.

Лінійність аналітичного методу стосується здатності давати результати випробувань. Вони прямо пропорційні концентрації аналіту у зразку в межах певного діапазону. Дослідження лінійності є важливими. Вони встановлюють діапазон методу, в якому можна отримати точні та прецизійні результати.

Межа виявлення аналітичного методу (LOD) – це найменша кількість аналіту у зразку, яку можна виявити. Межа кількісного визначення (LOQ) – це найнижча концентрація, за якої аналіт можна кількісно визначити з прийнятною точністю.

LOD і LOQ є критичними параметрами у валідації методу. Вони дають уявлення про чутливість та надійність аналітичного методу. Вони допомагають визначити, чи він придатний для виявлення та кількісного визначення аналітів при низьких концентраціях. Калібрувальні криві були лінійними в діапазоні концентрацій 16,41–525 нг/мл та 17,97–575 нг/мл для гіперозиду та сапоніну Chfs01. Усі калібрувальні криві показали хорошу лінійну регресію. Коефіцієнти кореляції були $R^2 > 0,999$. Метод показав, що

LOD та LOQ становили 0,28 нг/мл та 0,86 нг/мл для гіперозиду, 0,48 нг/мл та 1,44 нг/мл для сапоніну Chfs01.

Під час розробки аналітичних методів точність визначається тим, наскільки точно фактичне значення відповідає істинному значенню. Важливість точності можна описати терміном «правдивість». Точність аналітів оцінювали шляхом проведення процедури екстракції на контрольній рослинній матриці. До неї додавали стандартний розчин аналітів у трьох концентраціях, що очікуються у фактичних зразках рослин. Цей підхід дозволяє оцінити, наскільки ефективно аналітичний метод вимірює точні значення аналітів у фактичних зразках. Точність методу перевіряли шляхом додавання стандартної суміші розчинів у трьох концентраціях (50,20, 100,40 та 150,60 нг/мл для гіперозиду; 50,80, 101,60 та 152,40 нг/мл для сапоніну Chfs01). Холості зразки з незбагаченого рослинного екстракту аналізували одночасно зі зразками збагачених речовин. Споріднені сполуки показали загальний коефіцієнт відновлення від 98,46% до 102,05%, з RSD від 0,38% до 1,22%. Кореляція між збагаченими (доданими) та визначеними концентраціями доводить, що метод має прийнятну точність (рис. 2.1.2).

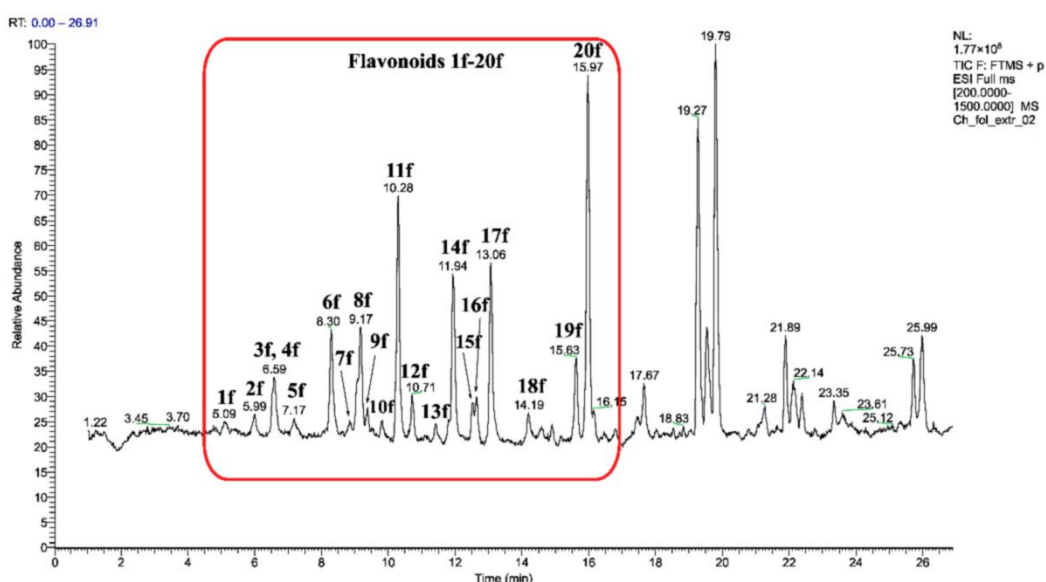


Рисунок 2.1.2. Профілювання флавоноїдів екстракту EtOH з надземної частини *C. foliosum* Asch. у режимі позитивних іонів за допомогою UHPLC-HRMS.

Раніше сировина *Хвощу лісового (Equisetum sylvaticum)* (Волинське Полісся) була досліджена на вміст важких металів (табл. 2.1.1).

Таблиця 2.1.1. Результати дослідження наявності важких металів в рослинних зразках *Хвощу лісового (Equisetum sylvaticum)* (Волинське Полісся).

№	Вміст металу	<i>Хвощ лісовий</i>	Норма (ВООЗ)
1	Алюміній (Al), мг/кг	<0.01	-
2	Миш'як (As), мг/кг	<0.01	1.0
3	Барій (Ba), мг/кг	12.5	-
4	Берилій (Be), мг/кг	<0.01	-
5	Вісмут (Bi), мг/кг	<0.01	-
6	Кадмій (Cd), мг/кг	<0.01	0.02
7	Кобальт (Co), мг/кг	<0.01	-
8	Хром (Cr), мг/кг	<0.01	1.30
9	Мідь (Cu), мг/кг	20.4	-
10	Марганець (Mn), мг/кг	<0.01	-
11	Молібден (Mo), мг/кг	<0.01	-
12	Нікель (Ni), мг/кг	<0.01	10
13	Ртуть (Hg), мг/кг	<0.01	0.1
14	Свинець (Pb), мг/кг	<0.01	2
15	Стибій (Sb), мг/кг	<0.01	-
16	Селен (Se), мг/кг	<0.1	-

17	Олово (Sn), мг/кг	2.2	-
18	Стронцій (Sr), мг/кг	10.4	-
19	Титан (Ti), мг/кг	0.5	-
20	Ванадій (V), мг/кг	<0.1	-
21	Вольфрам (W), мг/кг	<0.1	-
22	Цинк (Zn), мг/кг	21.3	-
23	Цирконій (Zr), мг/кг	<0.1	-

Важкі метали були виявлені у досліджуваних зразків: барій (Ba), мідь (Cu), олово (Sn), стронцій (Sr) та цинк (Zn).

ВООЗ, інші структури та нормативні документи не встановлюють норми важких металів у лікарській рослинній сировині.

Щодо потенційного джерела важких металів – забруднення може бути наслідком бойових дій та вибухів, бойових навчань поблизу території 3 цих територій були взяті зразки сировини (табл. 2.1.2).

Таблиця 2.1.2. Результати дослідження наявності пестицидів в зразках.

№ з/п	Вміст пестицидів мг/кг	Норма*	
		<i>Хвощ лісовий</i>	мг/кг
1	DDT	---	1,0
2	Hexachlorcyclohexane	---	0,3
3	Lindan	---	0,6
4	Diazinone	---	0,5

5	Malathione	---	1,0
6	Chlordane	---	0,05
7	Primiphos methyl	---	4,0

*Згідно з Європейською Фармакопсею 2019. 10 видання. ТОМ. 1. ст. 308-310

Поєднанням методів газової хроматографії та мас-спектрометрії не виявлено залишки пестицидів у зразках рослинної сировини.

Хроматограми представлено на рисунках 2.1.1, 2.1.2. Характерні піки відповідають виявленим пестицидам.

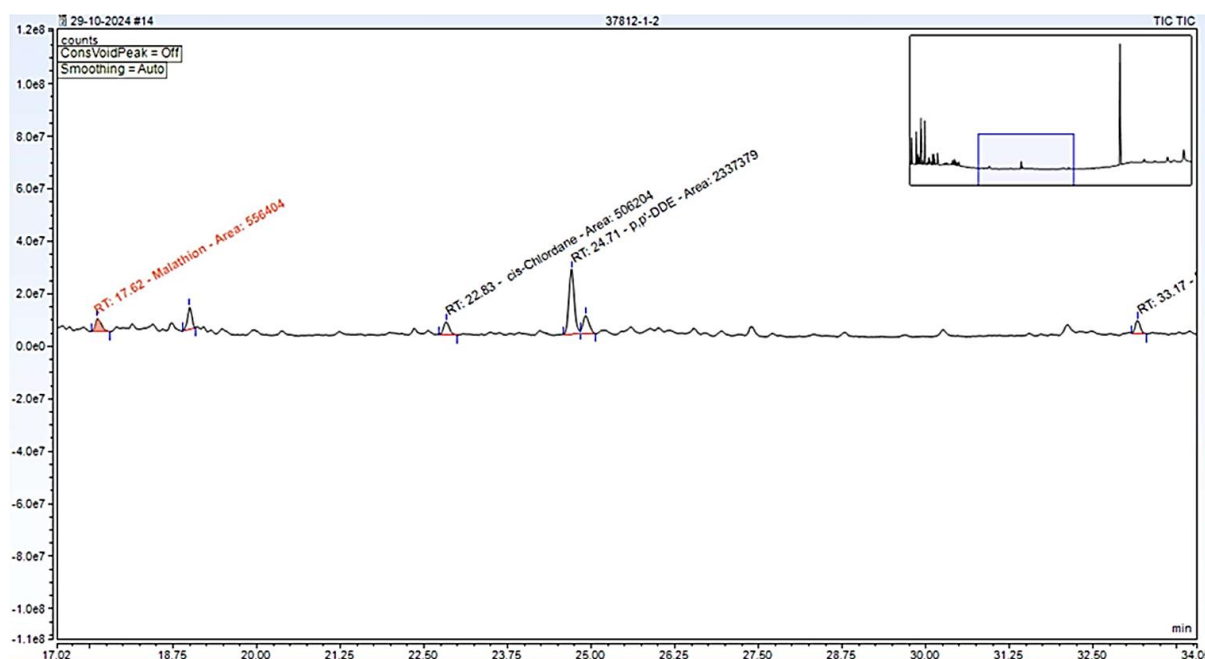


Рисунок 2.1.1. Хроматограма зразку.

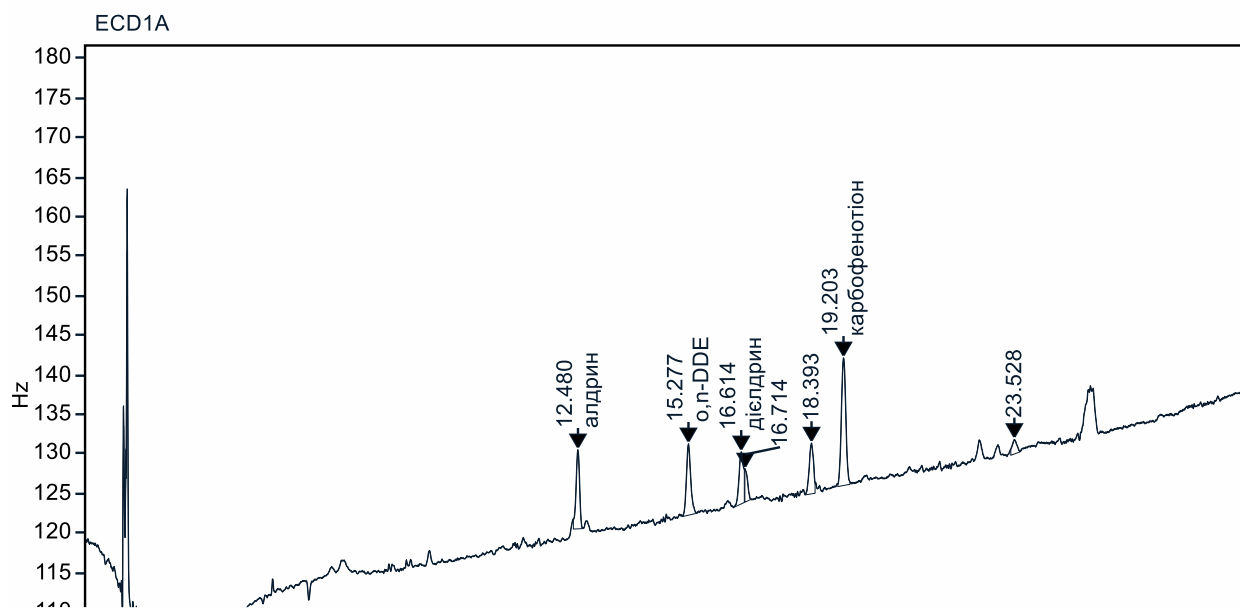


Рисунок 2.1.2. Хроматограма зразку *Equisetum sylvaticum*.

Концентрація пестицидів розраховували за формулою:

$$X = \frac{S}{S_0} \times \frac{m_0}{5} \times \frac{0,1}{25} \times \frac{1,8}{m_c} \times \frac{P}{100} \times 1000$$

де: X — вміст діючої речовини у препараті (мг/кг).

S — площа плями препарату на хроматограмі.

S₀ — площа плями стандарту на хроматограмі.

m₀ — маса стандарту (мг).

m_s — маса препарату, що досліджується (г).

P — вміст діючої речовини у стандарті (%).

Таким чином, при роботі із сировиною *Equisetum sylvaticum* адаптували методики пробопідготовки, умови спектрального і хроматографічного досліджень випробовуваних об'єктів рослинного походження.

Хвощ	S	So	mo	5 V	25	1.8	ms	P	10 мг/кг
аладин	61.509	5127.39	5.42	5	25	1.8	6.238	98.4	0.014769093
о-пDDE	66.632	184183.06	15.12	5	25	1.8	6.238	99.5	0.001256
диелдрин	49.474	112695.934	15.14	5	25	1.8	6.238	97.05	0.00149
межа вмісту мг/кг	алад+діел	0.05							
	о-пDDE	1							

За допомогою методу газової хроматографії виявлено пестициди Алдрин, *о,п*-ДДЕ, Діелдрин та їх метаболіти. Об'єкти містять заборонені для використання пестициди – Алдрин, *о,п*-ДДЕ, *п,п*-ДДТ, Діелдрин.

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

Хвощ лісовий не є фармакопейною рослиною, на відміну від хвоща польового, але методи його дослідження з науковою метою аналогічні.

Матеріали та методи.

Для проведення інструментальних досліджень використовували газовий хроматограф: Agilent 6890A з електронезахоплювальним детектором.

Умови хроматографування:

- колонка – HP-1 (100 % полі диметилсилоксан), 30 м × 0,32 мм × 0,25 мкм; колонка була підключена до переднього електронезахоплювального детектора (ECD);
- газ-носії — азот, подача в режимі постійного потоку 3,9998 мл/хв (початково), з постпрограмним потоком 2,314 мл/хв.
- Контроль режиму потоку здійснювався у режимі постійного потоку (constant flow).

Температурна програма хроматографічного аналізу:

- початкова температура: 80 °C (утримання 1 хв),
- нагрівання зі швидкістю 30 °C/хв до 150 °C (утримання 3 хв),
- далі — 4 °C/хв до 280 °C (без утримання),
- кінцева температура: 280 °C,
- температура інжектора — 250 °C,
- інжекція здійснювалась у режимі спліту (split) зі співвідношенням 20:1. Об'єм ін'єкції складав 1 мкл.

Температура детектора ECD — 290 °C. Детектор працював із потоком макрогазу азоту 30 мл/хв, анодним потоком — 6 мл/хв. Задній детектор FID був вимкнений.

Час хроматографування – 39 хв

Ідентифікацію сполук проводили за часом утримування з порівнянням до стандартів.

Калібрувальний графік будували на основі серії стандартних розчинів.

Обчислення концентрацій виконували за площею піків у хроматограмах.

Пробопідготовка

10,00 г подрібненого та гомогенізованого зразка екстрагували 100 мл ацетону за кімнатної температури протягом 20 хв при інтенсивному перемішуванні. До екстракту додавали 1,00 мл розчину внутрішнього стандарту — карбофенотіону в толуолі (концентрація 1,80 мкг/мл).

Суміш гомогенізували, фільтрували під вакуумом, а залишок на фільтрі двічі промивали ацетоном (по 25 мл). Об'єднаний фільтрат концентрували на ротаційному випарнику за температури бані не вище 40 °C до об'єму $\approx$ 1–2 мл, додаючи кілька порцій толуолу (по 2–3 мл) для повного азеотропного видалення ацетону.

Сухий залишок розчиняли в 8 мл толуолу, розчин фільтрували через мембранний ПТФЕ-фільтр 0,45 мкм і доводили толуолом точно до 10,0 мл (*розчин А*).

Розчин А додатково очищали методом гель-проникної хроматографії (GPC) на колонці з нержавіючої сталі 300 × 7,8 мм, заповненій сополімером стирол-дивінілбензолу (частинки 5 мкм).

Елюент — толуол, швидкість потоку 1,0 мл/хв. Збирали фракцію 8,5–10,9 мл, що містила цільові хлорорганічні сполуки та внутрішній стандарт (*розчин В*). При необхідності розчин В упарювали під струменем азоту й доводили толуолом до потрібного об'єму перед ГХ-аналізом.

При проведенні комп'ютерного аналізу використовували програму OpenLab CDS.

Для проведення досліджень методом ВЕРХ використовували реактиви:

- ацетон (чистоти для ВЕРХ),
- толуол (чистоти для ВЕРХ).

Результати та їх обговорення.

Використовували стандартні зразки пестицидів (концентрація, наважка):

№	Назва	Стандарт №	Концентрація, % (P)	Наважка (m_0)
1	Метамідофос	S20-383	98,1	5,16
2	Дихлорфос (ДДВФ)	S20-094	100,0	0,300
3	Ацефат	S20-402	99,6	4,59
4	Метакрифос	S20-380	96,1	0,48
5	Азинфос-етил	S20-401	99,1	5,6
6	Монокротофос-етил	S20-370	100	3,56
7	Базудин (діазинон)	S20-091	100	0,300
8	Хлорпірифос-метил	S20-394	99	20,2
9	Пассо (Алахлор)	S20-100	99,6	0,3
10	Фенхлорфос	S20-391	99,7	5,24
11	Фенітротіон	S20-346	95,5	5,1
12	Дихлорфлюанід	S20-393	99,8	4,8
13	Карбофос (малатіон)	S20-098	100,0	0,30
14	Паратіон	S20-349	99,6	1,23
15	Квіналфос	S20-345	99,8	4,84
16	Бромфос-метил	S20-398	99,6	0,89
17	Стомп	S20-395	99	0,3
18	Пиримифос-етил	S20-346	96,3	2,35
19	Хлорпирифос-етил	S20-395	99	6,2
20	Метидатіон	S20-378	96,3	5,6
21	Бромфос-етил	S20-399	97,3	0,12
22	Етон	S20-392	96,9	3,78
23	Фосмет	S20-347	99,8	1,3
24	Бромпропілат (Неорон)	S21-232	100,0	0,3
25	Азинфос-метил	S20-400	98,7	1,59
26	Фозалон	S21-235	100	0,3
27	λ-цигалотрин	S21-227	100	0,3
28	Мірекс	S20-368	98,6	5,88
29	Бульбок (бета-цифлутрин)	S23-220	100	0,3
30	Флюцитринат	S20-382	97,3	4,9
31	Процимідон	S20-352	99,7	19,6
32	Хлорфенвінфос	20-396	97,2	20,2
33	Флувалінат	23-226	100	0,2
34	Хлордан	20-397	100	0,3
35	Мекарбам	20-381	98,5	1,9
36	Вінклозолін	S20-351	99,6	5,01

37	Карбофенотіон	S19-254	98,7	5,19
38	Фенпропатрин	S23-379	99,20	5,04
39	Хлортал-диметил	S20-272	99,61	5,18
40	Текназен	S23-276	99,80	1,36
41	S421	S23-247	98,80	5,25
42	Квінтоцен	S23-250	94,84	6,16
43	Фентіон	S23-250	96,19	5,46
44	Профенфос	S23-248	99,00	5,82
45	Фенсульфотіон	S23-350	97,10	1,37
46	Тетрадифон	S20-369	99,20	3,75
47	Параксон етил	S23-251	98,30	3,25
48	Фонофос	S23-274	98,00	9,12

Отримані хроматограми представлено на рисунках 3.1-3.3.

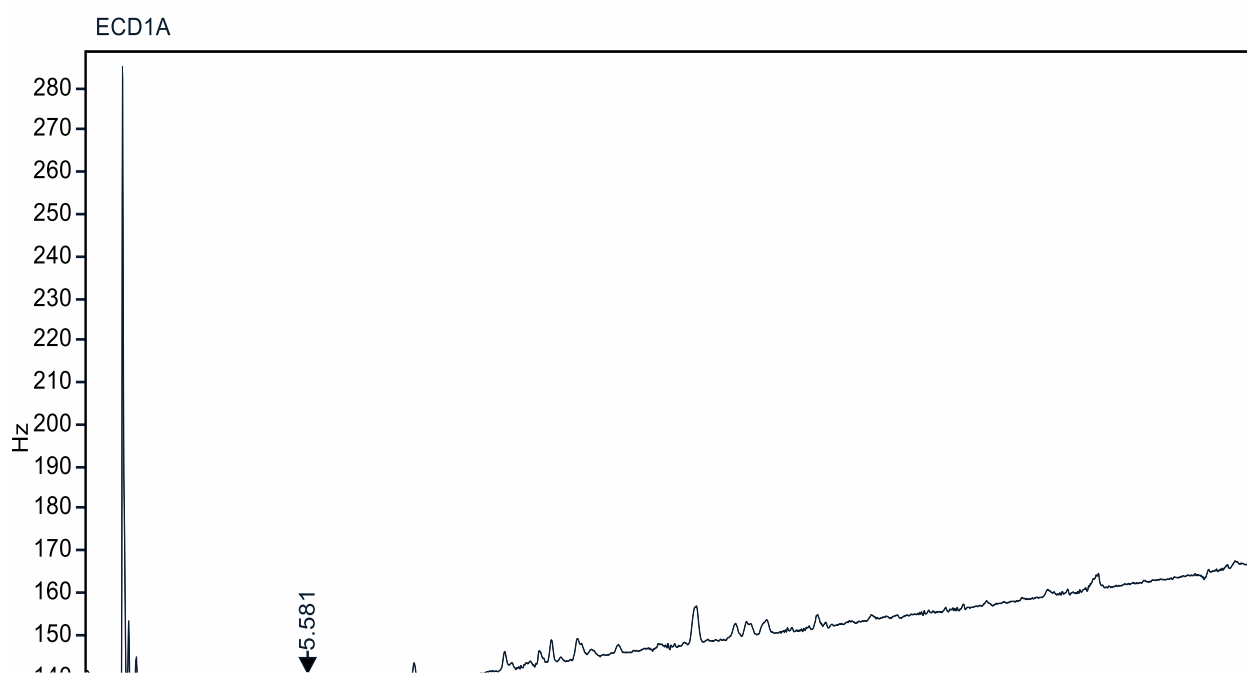


Рисунок 3.1. Хроматограма бланку.

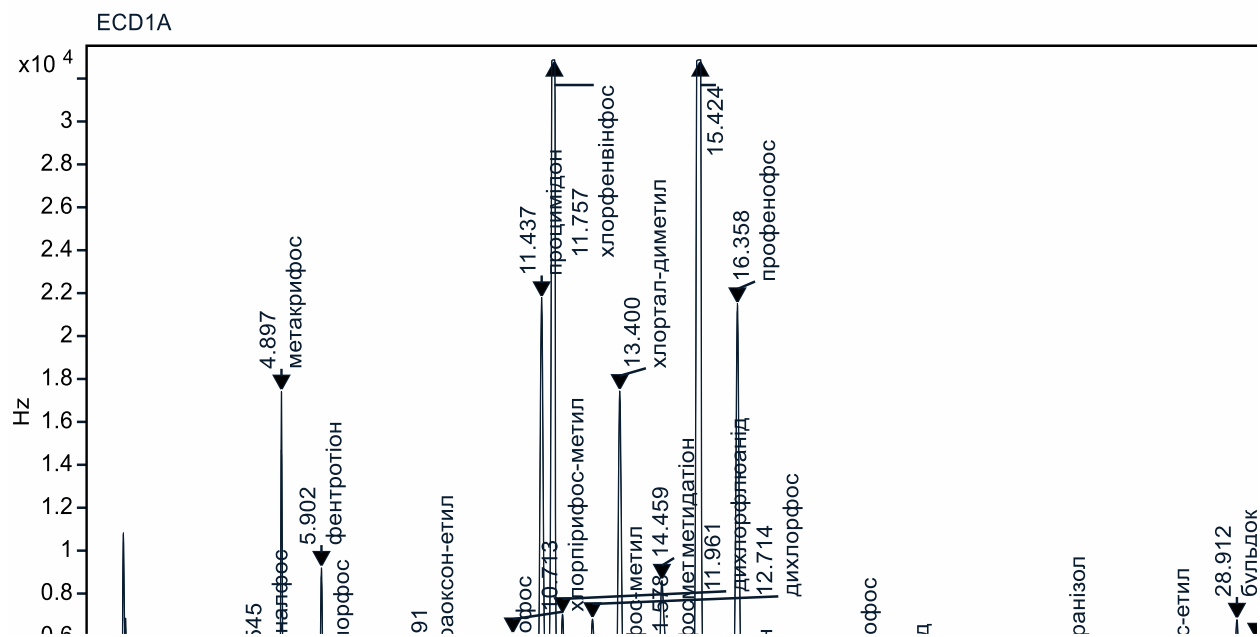


Рисунок 3.2. Хроматограма стандарту.

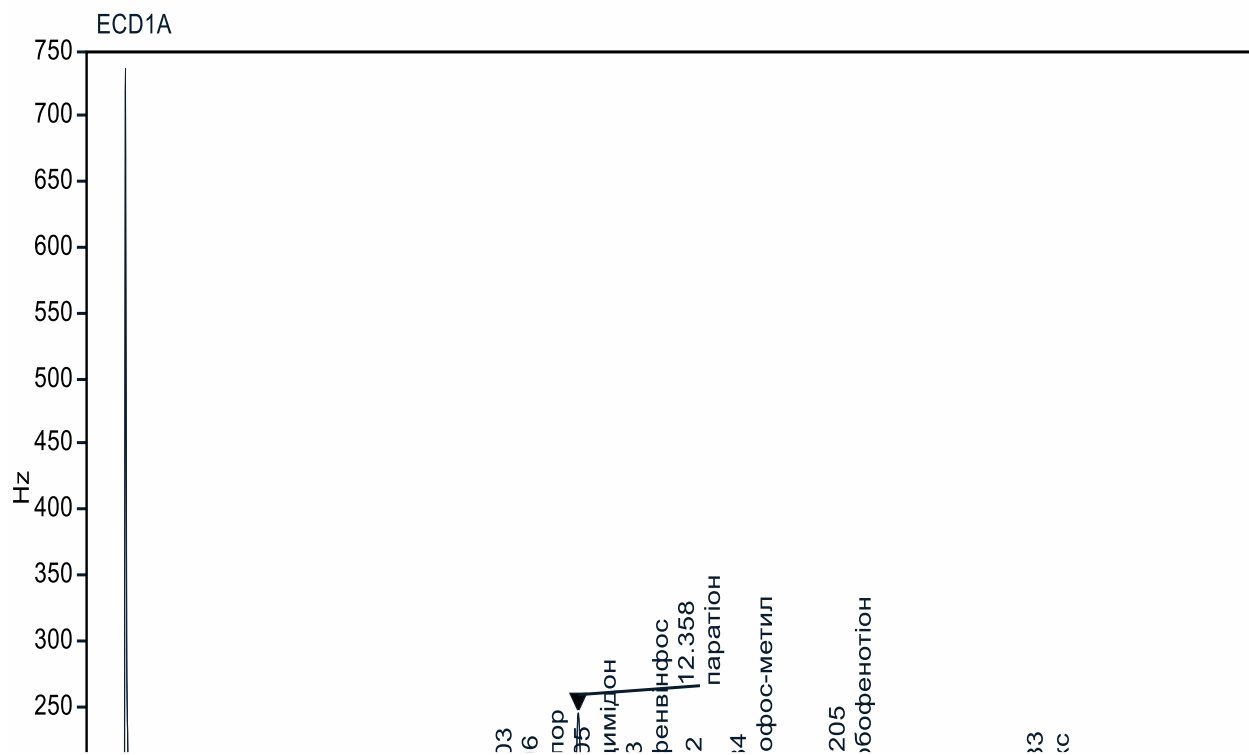


Рисунок 3.3. Хроматограма випробовуваного зразку.

Отримані результати представлено на рисунках 3.4, 3.5.

acefat																	
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Хвош																	
	s421		фенхлорфос		ацефат		квіналфос		метакрифос		метамідофос		піриміфос-метил		фентротіон		
	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Середнє	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Хвош																	
	квінтозен		текнацен		монокротофос		фосфамід		фентіон		параоксон-етил		пентахлоранізол		діазінон		
	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Середнє	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Хвош																	
	бромфос-етил		метафос		хлорпірифос-метил		вінкозолін		алахлор		процимідон		фосмет		хлорфеноінфос		
	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	
	-	-	-	-	-	-	-	-	11,106	136,415	11,405	229,482	-	-	11,793	116,343	
	-	-	-	-	-	-	-	-	11,104	141,556	11,397	239,267	-	-	11,793	118,904	
	-	-	-	-	-	-	-	-	11,111	142,396	11,402	235,233	-	-	11,795	119,344	
Середнє	-	-	-	-	-	-	-	-	11,107	140,122	11,401	234,661	-	-	11,794	118,197	
Хвош																	
	дихлорфлюанід		дихлорфос		хлортал-диметил		стомп		мекарбам		метидатіон		кельтан		профенофос		
	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Середнє	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Рисунок 3.4. Результати: виявлено пестициди: Алахлор Rt = 11.107 хв, Процимідон Rt = 11.401 хв.

Хвош																	
	дихлорфлюанід		дихлорфос		хлортал-диметил		стомп		мекарбам		метидатіон		кельтан		профенофос		
	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Середнє	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Хвош																	
	етіон		фенсульфатіон		карбофенотіон		тетрадіфон		метоксихлор		бромпропілат		фенпропатрин		азинфос-метил		
	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	
	-	-	-	-	19,205	273,175	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	19,202	274,784	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	19,216	282,371	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Середнє	-	-	-	-	19,208	276,777	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Хвош																	
	фозалон		мірекс		азинфос-етил		лямбда-цигалотран		бульдок		флуцитринат		флувалінат-1		флувалінат-2		
	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	RT	Area	
	-	-	24,183	115,336	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	24,181	119,282	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	24,184	128,978	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Середнє	-	-	24,183	121,199	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Рисунок 3.5. Результати: виявлено пестициди: Хлорфенвінфос Rt = 11.794 хв, Карбофенотіон Rt = 19.208 хв, Мірекс Rt = 24.183 хв.

Формула розрахунку:

$$X = \frac{S}{S_0} \times \frac{m_0}{25} \times \frac{1}{20} \times \frac{1,8}{m_s} \times \frac{P}{100} \times 1000$$

де:

S – площа піка пестицида в зразку;

S_0 – площа піку пестициду в стандарті;

m_0 – наважка стандарту;

m_s – наважка зразку

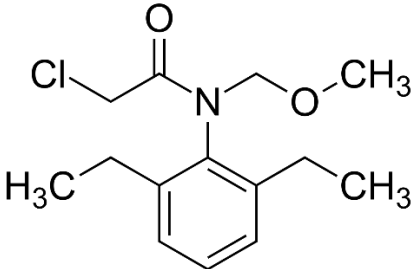
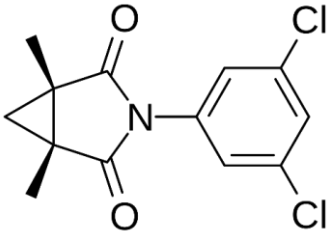
Хвощ лісовий – не фармакопейна рослина

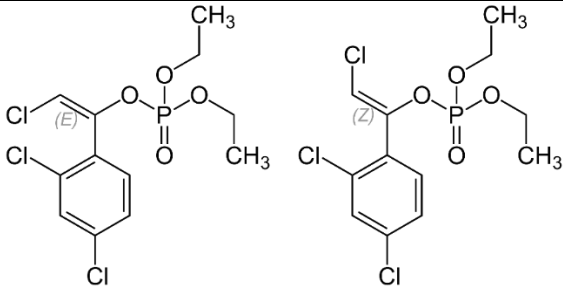
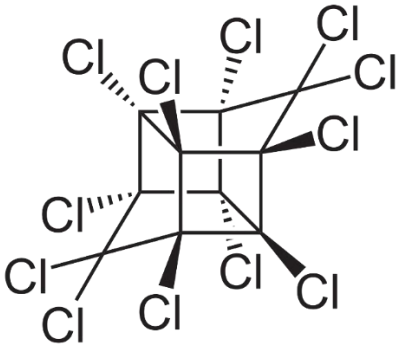
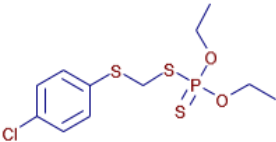
Пестицид	S	S ₀	m ₀	m _s	Розрахункова концентрація, мг/кг
алахлор	140,122	13490,624	0,3	4,533	0,00247464
процімідон	234,661	149884,724	19,6	4,533	0,02429694
хлорфенвінфос	118,197	249200,447	20,2	4,533	0,00760897
Мірекс	121,199	12577,463	5,98	4,533	0,045764

Чебрець – фармакопейна рослина

Пестицид	S	S ₀	m ₀	m _s	Розрахункова концентрація, мг/кг
фенхлорфос	187,883	11726,09	5,29	5,903	0,05153649
метафос	106,902	593,321	3,25	5,903	0,35604455
хлорпірифос	105,6963	43882,463	20,2	5,903	0,02937549
процімідон	279,272	149884,724	19,6	5,903	0,02220501
хлорфенвінфос	166,94	249200,447	20,2	5,903	0,00825264
Мірекс	176,159	12577,463	5,98	5,903	0,05107904

В результаті проведених досліджень встановлено, що в наданій на дослідження рослинної сировині Хвощу лісового методом ГХ виявлено 5 пестицидів: Алахлор $R_t = 11.107$ хв, Процимідон $R_t = 11.401$ хв, Хлорфенвінфос $R_t = 11.794$ хв, Карбофенотіон $R_t = 19.208$ хв, Мірекс $R_t = 24.183$ хв. Розраховано їх кількісний вміст.

Пестицид	Рослинна сировина Хвощу лісового (зразки із Волинського Полісся) МДЗ (ЄС), мг/кг
Алахлор 	ГХ: $R_t = 11.107$ хв Розрахункова концентрація (мг/кг): 0,00247464 МДЗ (ЄС), мг/кг: 0.01
Процимідон 	ГР: $R_t = 11.400$ хв Розрахункова концентрація (мг/кг): 0,02429694 МДЗ (ЄС), мг/кг: 0.01-0.05
Хлорфенвінфос	ГХ: $R_t = 11.793$ хв Розрахункова концентрація (мг/кг):

	0,00760897 МДЗ (ЄС), мг/кг: 0.01-0.05
Мірекс 	<i>ГХ: Rt = 24.182 хв</i> <i>Розрахункова</i> <i>концентрація (мг/кг):</i> 0,045764 МДЗ (ЄС), мг/кг: 0.01
Карбофенотіон (Carbophenothion) – це високотоксичний інсектицид, який належить до І класу небезпеки 	<i>ГХ:</i> <i>Rt = 19.209 хв</i> МДЗ (ЄС), мг/кг: 0.01

Таким чином, при порівнянні результатів аналізу пестицидів у складі сировини фармакопейної та не фармакопейної рослин (територія Волинського Полісся) можна відзначити наступні особливості:

Чебрець повзучий	Хвощ лісовий
-------------------------	---------------------

<i>(Thymus serpyllum)</i> Фармакопейна рослина	<i>(Equisetum sylvaticum)</i> Не фармакопейна рослина
7 пестицидів: Фенхлорфос $R_t = 3.879$ хв, Метафос $R_t = 10.283$ хв, Хлорпірифос-метил $R_t = 10.665$ хв, Процимідон $R_t = 11.400$ хв, Хлорфенвінфос $R_t = 11.793$ хв, Карбофенотіон $R_t = 19.209$ хв, Мірекс $R_t = 24.182$ хв	5 хлорорганічних пестицидів (ХОС): Алохлор $R_t = 11.107$ хв, Процимідон $R_t = 11.401$ хв, Хлорфенвінфос $R_t = 11.794$ хв, Карбофенотіон $R_t = 19.208$ хв, Мірекс $R_t = 24.183$ хв
<i>Розрахункова концентрація (мг/кг)</i>	
відсутній	Алахлор 0,00247464
Процимідон 0,02220501	Процимідон 0,02429694 (більше у 1,1 рази)
Хлорфенвінфос 0,00825264 (більше у 1,1 рази)	Хлорфенвінфос 0,00760897
Мірекс 0,05107904 (більше у 1,2 рази)	Мірекс 0,045764
Фенхлорфос Метафос Хлорпірифос	відсутні

ВИСНОВКИ

1. Адаптовано методики пробопідготовки, умови хроматографічного дослідження методом газової хроматографії (ГХ) випробовуваних об'єктів рослинного походження – зразків сировини Хвощу лісового (*Equisetum sylvaticum*) з територій Волинського Полісся.

2. В результаті проведених хіміко-токсикологічних досліджень методом ГХ встановлено, що в наданій на дослідження сировині Хвощу лісового, виявлено 5 хлорорганічних пестицидів: Алохлор $R_t = 11.107$ хв, Процимідон $R_t = 11.401$ хв, Хлорфенвінфос $R_t = 11.794$ хв, Карбофенотіон $R_t = 19.208$ хв, Мірекс $R_t = 24.183$ хв, а розрахункова концентрація (мг/кг) ХОС перевищена у випробовуваних зразках у 0,76-4.5 рази (МДЗ, за законодавством ЄС, мг/кг: 0.01).

3. При аналізі отриманих результатів хіміко-токсикологічного дослідження сировини не фармакопейної рослини Хвощу лісового та раніше отриманих результатів дослідження фармакопейної рослини Чебрець повзучий виявлено, що сировина Чебрецю повзучого містить ФОС і ХОС, а Хвощу лісового – тільки ХОС, а концентрація (мг/кг) пестицидів Мірекс, Хлорфенвінфос в сировині Чебрецю повзучого у 1,1-1,2 рази вище, концентрація (мг/кг) Процимідону у сировині Хвощу лісового у 1,1 рази нижча. Фенхлорфос, Метафос та Хлорпірифос в сировині Хвощу лісового не знайдені.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Donoghue P.C., Harrison C.J., Paps J., Schneider H. 2021. The evolutionary emergence of land plants. – *Curr. Biol.* 31 (19): R1281–R1298. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.07.038>.
2. Du H., Ran J., Feng Y., Wang X. 2020. The flattened and needlelike leaves of the pine family (Pinaceae) share a conserved genetic network for adaxial-abaxial polarity but have diverged for photosynthetic adaptation. – *BMC Evol. Biol.* 20:131. <https://doi.org/10.1186/s12862-020-01694-5>.
3. Hedman H., Zhu T., von Arnold S., Sohlberg J.J. 2013. Analysis of the WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN gene family in the conifer *Picea abies* reveals extensive conservation as well as dynamic patterns. – *BMC Plant Biol.* 13: 89. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-89>.
4. Hernández-Hernández B., Tapia-López R., Ambrose B.A., Vasco A. 2021. R2R3-MYB gene evolution in plants, incorporating ferns into the story. – *Int. J. Plant. Sci.* 182 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1086/710579>.
5. Hirakawa Y. 2022. Evolution of meristem zonation by CLE gene duplication in land plants. – *Nature Plants.* 8: 735–740. <https://doi.org/10.1038/s41477-022-01199-7>.
6. Francis-Baker, Tiffany (2021). *Concise Foraging Guide*. The Wildlife Trusts. London: Bloomsbury. p. 88. ISBN 978-1-4729-8474-6.
7. Jovanović, A.A.; Đorđević, V.B.; Zdunić, G.M.; Pljevljakušić, D.S.; Šavikin, K.P.; Gođevac, D.M.; Bugarski, B.M. Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using maceration, heat- and ultrasound-assisted techniques. *Sep. Purif. Technol.* 2017, 179, 369–380.
8. Jarić, S.; Mitrović, M.; Pavlović, P. Review of Ethnobotanical, Phytochemical, and Pharmacological Study of *Thymus serpyllum* L. *Evid Based Complement Alternat. Med.* 2015, 101978.
9. Hong Wu, H.; Moser, C.; Wang, H.Z.; Høiby, N.; Song, Z.J. Strategies for combating bacterial biofilm infections. *Int. J. Oral. Sci.* 2014, 7, 1–7.

10. Verderosa, A.D.; Totsika, M.; Fairfull-Smith, K.E. Bacterial biofilm eradication agents: A current review. *Front. Chem.* 2019, 7, 824.
11. Mousavian, D.; Nafchi, A.M.; Nouri, L.; Abedinia, A. Physicomechanical properties, release kinetics, and antimicrobial activity of activated low-density polyethylene and orientated polypropylene films by Thyme essential oil active component. *J. Food Meas. Charact.* 2021, 15, 883–891.
12. Romanova M.A., Domashkina V.V., Maksimova A.I., Pawlowski K., Voitsekhovskaja O.V. 2023. All together now: Cellular and molecular aspects of leaf development in lycophytes, ferns, and seed plants. – *Front. Ecol. Evol.* 11. <https://doi.org/10.3389/fevo.2023.1097115>.
13. Jeican, I.I.; Tudoran, B.L.; Florea, A.; Flonta, M.; Trombitas, V.; Apostol, A.; Dumitru, M.; Aluaş, M.; Junie, L.M.; Albu, S. Chronic rhinosinusitis: MALDI-TOF mass spectrometry microbiological diagnosis and electron microscopy analysis; experience of the 2nd otorhinolaryngology clinic of Cluj-Napoca, Romania. *J. Clin. Med.* 2020, 9, 3973.
14. Naghdibadi, H.; Abdollahi, M.; Mehrafarin, A.; Ghorbanpour, M.; Tolyat, M.; Qaderi, A.; Yekta, M.G. An Overview on Two Valuable Natural and Bioactive Compounds, Thymol and Carvacrol, in Medicinal Plants. *J. Med. Plants*, 2027, 16, 1–32.
15. Baj, T.; Biernasiuk, A.; Wróbel, R.; Malm, A. Chemical composition and in vitro activity of *Origanum vulgare* L., *Satureja hortensis* L., *Thymus serpyllum* L. and *Thymus vulgaris* L. essential oils towards oral isolates of *Candida albicans* and *Candida glabrata*. *Open Chem.* 2020, 18, 108–118.
16. Kovačević, Z.; Radinović, M.; Čabarkapa, I.; Kladar, N.; Božin, B. Natural agents against bovine mastitis pathogens. *J. Antibiot.* 2021, 10, 205.
17. Šojić, B.; Tomović, V.; Kocić-Tanackov, S.; Kovačević, D.B.; Putnik, P.; Mrkonjić, Ž.; Đurović, S.; Jokanović, M.; Ivić, M.; Škaljac, S.; et al. Supercritical extracts of wild thyme *Thymus serpyllum* L. by-product as

- natural antioxidants in ground pork patties. *LWT Food Sci. Technol.* 2020, 130, 109661.
18. Camele, I.; Elshafie, H.S.; Caputo, L.; De Feo, V. Anti-quorum Sensing and Antimicrobial Effect of Mediterranean Plant Essential Oils Against Phytopathogenic Bacteria. *Front. Microbiol.* 2019, 10, 2619.
 19. Kačániová, M.; Galovičová, L.; Ivanišová, E.; Vukovic, N.L.; Štefániková, J.; Valková, V.; Borotová, P.; Žiarovská, J.; Terentjeva, M.; Felšöciová, S.; et al. Antioxidant, antimicrobial and antibiofilm activity of coriander L. essential oil for its application in foods. *Foods*, 2020, 9, 282.
 20. Střelková, T.; Nemes, B.; Kovács, A.; Novotný, D.; Božík, M.; Klouček, P. Inhibition of Fungal Strains Isolated from Cereal Grains via Vapor Phase of Essential Oils. *Molecules*, 2021, 26, 1313.
 21. Heidenreich PA, Bozkurt B, Aguilar D, Allen LA, Byun JJ, Colvin MM, Deswal A, Drazner MH, Dunlay SM, Evers LR, Fang JC, Fedson SE, Fonarow GC, Hayek SS, Hernandez AF, Khazanie P, Kittleson MM, Lee CS, Link MS, Milano CA, Nwacheta LC, Sandhu AT, Stevenson LW, Vardeny O, Vest AR, Yancy CW., ACC/AHA Joint Committee Members. 2022 AHA/ACC/HFSA Guideline for the Management of Heart Failure: A Report of the American College of Cardiology/American Heart Association Joint Committee on Clinical Practice Guidelines. *Circulation*. 2022 May 03;145(18):e895-e1032.
 22. Soboleva MS, Loskutova EE. Analysis of Preferences in the Use of Fixed-Doses Combinations Antihypertensive Drugs in the Regions of Far-Eastern Federal District. *Clinicoecon Outcomes Res.* 2020;12:265-272.
 23. Hallberg P, Persson M, Axelsson T, Cavalli M, Norling P, Johansson HE, Yue QY, Magnusson PK, Wadelius C, Eriksson N, Wadelius M. Genetic variants associated with angiotensin-converting enzyme inhibitor-induced cough: a genome-wide association study in a Swedish population. *Pharmacogenomics*. 2017 Feb;18(3):201-213.

24. WHO bacterial priority pathogens list, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. [cited 2024 Jun 2]. Available from: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240093461>.
25. Y.L. Lee, W.C. Ko, P.R. Hsueh. Geographic patterns of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in the Asia-Pacific Region: results from the Antimicrobial Testing Leadership and Surveillance (ATLAS) Program, 2015–2019. *Antimicrob Agents Chemother*, 66 (2) (2022), pp. e02000-e02021 <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.02000-21>.
26. Vasco A., Ambrose B.A. 2020. Simple and divided leaves in ferns: exploring the genetic basis for leaf morphology differences in the genus *Elaphoglossum* (Dryopteridaceae). – *Int. J. Mol. Sci.* 21 (15): 5180. <https://doi.org/10.3390/ijms21155180>
27. Державна Фармакопея України. 2-ге вид., у 3-х т. Державне підприємство «Український науковий фармакопейний центр якості лікарських засобів». Х.: Укр. наук. фармакоп. центр якості лік. засобів. 2014. Т. 2.
28. European Pharmacopoeia. Council of Europe, Strasbourg, 11-th ed., 2022. V.11.

SUMMARY

Kumanovska Yana

RESEARCH ON TOXICANTS IN THE COMPOSITION OF PLANT RAW MATERIALS OF Horsetail (*Equisetum sylvaticum*) BY GAS CHROMATOGRAPHY

The department of medicinal chemistry and toxicology
Scientific supervisor: PhD (Biol.) Meleshko R.A.

Keywords: composition of plant, toxicants, plant raw materials, Horsetail, *Equisetum sylvaticum*, GC, pesticides.

Introduction. Horsetail (*Equisetum sylvaticum*) is a perennial plant of the horsetail family, characterized by the appearance of spore-bearing (brownish, unbranched) and vegetative shoots that develop from a single rhizome. It is used in folk medicine as a diuretic, anti-inflammatory and hemostatic agent, but requires caution due to potential toxicity. The analysis of the plant raw material of horsetail (*Equisetum sylvaticum*) is carried out using a complex of pharmacognostic, chemical and physicochemical methods to confirm its authenticity. Horsetail is not a pharmacopoeial plant, unlike horsetail, but the methods of its research for scientific purposes are similar.

Materials and methods. Objects of research are raw materials of Horsetail, *Equisetum sylvaticum*, standards of pesticides. Research subject: development of conditions for GC study of chemical-toxicological analysis of the raw materials of Horsetail, *Equisetum sylvaticum*. Methods: Agilent 6890A with electron capture detector. Initial temperature: 80 °C (hold 1 min), heating at a rate of 30 °C/min to 150 °C (hold 3 min), then — 4 °C/min to 280 °C (without hold), final temperature: 280 °C, injector temperature — 250 °C, injection was performed in split mode with a ratio of 20:1. The injection volume was 1 µl. OpenLab CDS program.

Results. The sample preparation methods and conditions for chromatographic research by gas chromatography (GC) of tested objects of plant origin – samples of Horsetail (*Equisetum sylvaticum*) raw material from the territories of Volyn Polissya – were adapted.

Conclusions. When analyzing the obtained results of the chemical-toxicological study of the raw material of the non-pharmacopoeial plant Horsetail and the previously obtained results of the study of the pharmacopoeial plant Creeping Thyme, it was found that the raw material of Creeping Thyme contains PhO and ClO, and Horsetail contains only ClO, and the concentration (mg/kg) of pesticides Mirex, Chlorfenvinphos in raw materials of Creeping Thyme is 1.1-1.2 times higher, the concentration (mg/kg) of Procymidone in raw materials of Horsetail is 1.1 times lower. Fenchlorphos, Metaphos and Chlorpyrifos were not found in raw materials of Horsetail.

ДОДАТОК 1

Публікації, участь у роботі конференцій, симпозіумів.



Ректор Національного медичного університету
імені О. О. Богомольця, д. м. н., професор

В. о. завідувача кафедри фармакогнозії та ботаніки,
д. фарм. н., професор



Юрій КУЧИН

Уляна КАРПЮК



Ректор Національного медичного університету
імені О. О. Богомольця, д. м. н., професор

В. о. завідувача кафедри фармакогнозії та ботаніки,
д. фарм. н., професор



Юрій КУЧИН

Уляна КАРПЮК