

ШАМИЛОВ АРНОЛЬД АЛЕКСЕЕВИЧ

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ТЕОРЕТИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПОДХОДОВ К
СТАНДАРТИЗАЦИИ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДОВ *ARCTOSTAPHYLOS ADANS.*,
VACCINIUM L., *PRUNELLA L.* КАК ПОТЕНЦИАЛЬНЫХ ИСТОЧНИКОВ ФЕНОЛЬНЫХ
СОЕДИНЕНИЙ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ФАРМАЦИИ**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук**

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

Научный консультант:

доктор фармацевтических наук **Оленников Даниил Николаевич**

Официальные оппоненты:

Шмыгарева Анна Анатольевна – доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии, заведующий кафедрой;

Браславский Валерий Борисович – доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии, доцент кафедры;

Моисеев Дмитрий Владимирович – доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра управления и экономики фармации с курсами фармакогнозии, фармацевтической технологии, фармацевтической и токсикологической химии, профессор кафедры.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Томск.

Защита диссертации состоится «__» _____ 2024 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.061.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (<http://www.samsmu.ru/scientists/science/referats/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук, доцент

Жданова Алина Валитовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Важнейшей задачей современной фармацевтической отрасли является разработка и внедрение отечественных аналогов лекарственных растительных препаратов (ЛРП), а также поиск эффективных путей использования лекарственных растений (ЛР) и растительного сырья (ЛРС) в соответствии с принципами научной медицины. В связи с этим существуют реальные возможности успешного развития стратегии фармацевтической отрасли в Российской Федерации до 2030 года благодаря значительному прогрессу в области изучения химического состава лекарственных растений и их фармакологических свойств (Куркин В.А. и др., 2018). В этой связи является актуальным внедрение в отечественную медицинскую практику новых видов ЛРС и продуктов их переработки, при этом расширение ассортимента фитопрепаратов требует совершенствования системы стандартизации и контроля их качества (Бубенчикова В.Н. и др., 2016).

В плане решения современных проблем фармакогнозии особое методологическое значение приобретает понятие – ведущая группа биологически активных соединений (БАС). Благодаря ей сохраняется классическая фармакогнозия при наличии в растительном сырье нескольких химических групп БАС, обладающих разнообразной биологической активностью. При этом успешно решаются аналитические и технологические задачи, объясняются все особенности фармакотерапевтического действия фитопрепарата, а также прогнозируются эффекты, ранее неизвестные данному растению (Куркин В.А. и др., 2023).

В течение последних 15-20 лет фармакогнозия получила новые научные данные в области изучения химического состава лекарственных растений. Прогресс в этой сфере обусловлен использованием современных спектральных и физико-химических методов исследования. Применение спектроскопии ^1H - и ^{13}C -ЯМР, масс-спектрометрии позволило ученым изучить структуру различных биологически активных веществ. Внедрение методов тонкослойной хроматографии (ТСХ), газо-жидкостной хроматографии (ГЖХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) расширило возможности для стандартизации лекарственных растений и фитопрепаратов, что нашло отражение в Государственной фармакопее Российской Федерации XIV издания (Куркин В.А., 2019).

При большом перечне инструментальных методов еще одной из возникающих проблем является выбор правильных подходов к стандартизации ЛРС. Возможным решением является комбинация физических, физико-химических, химических и биологических методов анализа (цифровая микроскопия, ультрафиолетовая спектрофотометрия, ТСХ, ВЭЖХ, газовая хроматография (ГХ), инфракрасная спектрометрия (ИК-спектрометрия), ядерно-магнитный резонанс (ЯМР) и масс-спектрометрия, капиллярный электрофорез (КЭ), генетические исследования и другие. При использовании всех современных инструментальных методов необходимо научно обосновывать выбор одного из них и предлагать его в качестве метода и методики стандартизации ЛРС (Куркин В.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П., 2016).

В настоящее время наряду с существующими методами фармакогностического анализа целесообразным представляется совместное применение молекулярно-генетических методов. Это объясняется тем, что примеси и заменители ЛРС зачастую трудно отличить от аутентичного материала по химическому составу, а использование морфолого-анатомических признаков для определения видовой принадлежности растений обычно затруднительно или вообще невозможно, когда приходится иметь дело с тонко измельченными порошками, а именно в таком виде поступают на фармацевтический рынок многие виды лекарственного сырья (Жохова Е.В. и др., 2018).

Также одним из недостатков определения подлинности ЛРС микроскопическим методом (световая микроскопия) нередко является варибельность анатомо-диагностических признаков ЛРС в зависимости от различных факторов: размера частиц, способа измельчения, специфической обработки сырья (сырье традиционной китайской медицины), использования вспомогательных веществ в лекарственных растительных препаратах (Бобкова Н.В., 2021).

Следует также отметить: в литературных источниках появились сведения, что для большинства видов внутри рода наблюдается межвидовая гибридизация, которая при несущественных изменениях во внешних признаках ведет к значительным трансформациям в их

биосинтезе и, как следствие, химическом профиле и фармакологическом действии (Ногн К., 2006).

В описанных случаях наличие или отсутствие контаминации в аналитическом образце, возможно, установить с помощью ДНК-баркодинга (ДНК-штрихкодирования). Это объясняется тем, что данный метод является одним из самых современных и эффективных при определении подлинности ЛРС (Повыдыш М.Н. и др., 2007; Simmler C. et al., 2017).

В связи с развитием аналитической приборной базы в настоящее время наблюдается тенденция к разработке, совершенствованию, унификации и валидации новых и уже существующих методик контроля качества сырьевых источников растительного происхождения. На примере Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания по сравнению с ГФ СССР 11 издания прослеживается увеличение количества фармакопейных статей на ЛРС с 82 до 107, а также заметное улучшение их методического наполнения, то есть качества представленных методик. Также прослеживается тенденция к использованию методологического подхода, заключающегося в оценке качества ЛРС и ЛРП, как правило, не по одной, а по нескольким группам БАС (Рязанова Т.К. и др., 2022).

В ГФ РФ XIV издания для определения подлинности ЛРС активно используются хроматографические методы, а также различные методы макро- и микроскопии. При определении качества сырья в разделе «Испытания» введен сепарационный метод анализа – ВЭЖХ, который позволяет определить доминирующий компонент. Современные высокоселективные аналитические приборы позволяют ученым установить химический профиль лекарственных растений, обосновать новые подходы к стандартизации ЛРС и фитопрепаратов, содержащих разные классы веществ, предложить новые современные методики анализа давно изученных объектов. Точное определение БАС растительных объектов позволяет адекватно выбирать методику стандартизации, основное по содержанию соединение как вещество для определения подлинности вида и зачастую рода. Полные данные о химическом составе ЛРС позволят прогнозировать фармакологическую активность ЛРП и впоследствии учитывать это при разработке технологии возможной лекарственной формы. Речь идет о разных этапах - начиная от глубокого фитохимического анализа и завершая конечным продуктом – лекарственным препаратом.

Неотъемлемыми компонентами растений являются фенольные соединения, полисахариды, белки и т.д. Так, из 107 ФС – 39 (36,4 %) включают стандартизацию по содержанию флавоноидов, 9 (8,4 %) – по содержанию дубильных веществ, 6 (5,6 %) – по содержанию антраценпроизводных, 4 (3,7 %) – по содержанию лигнанов, 3 по – содержанию фенологликозидов, 3 (2,8 %) – по содержанию фенолокислот, 2 (2,8 %) – по содержанию фенилпропаноидов, 1 (1,4 %) – по содержанию кумаринов. Всего по фенольным соединениям 67 статей из 107, что в процентном соотношении составляет 62,6 % (Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания, 2018). Видно, что значительный удельный вес видов ЛРС анализируется по содержанию фенольных соединений, среди которых основную часть составляют флавоноиды (Куркин В.А., 2023).

В настоящее время особую значимость приобретают лекарственные средства растительного происхождения, применяемые для профилактики и лечения различных заболеваний. В этом отношении особый интерес представляют вторичные метаболиты лекарственных растений, которые в силу большого структурного разнообразия обладают широким спектром биологической активности (Куркин В.А., 2018).

Ряд научных статей показывает, что выделение из растительного объекта одного класса БАВ и очистка от других ведет к снижению фармакологического эффекта. Также при разработке лекарственных форм ученые учитывают химический состав и физико-химические параметры индивидуальных соединений. Полисахариды не только имеют выраженные фармакологические свойства, но и способны адсорбировать на себе другие вещества, влияя на их растворимость и, как следствие, на биодоступность конечного продукта (Ау Т.К. et al., 2001).

Исходя из вышеизложенного, актуальным является научное обоснование методологического подхода исследования лекарственных растений (толокнянка обыкновенная, толокнянка кавказская, брусника обыкновенная, черника обыкновенная, черника кавказская,

голубика высокорослая, клюква болотная, черноголовка обыкновенная, черноголовка крупноцветковая, черноголовка разрезная), общими для которых является наличие фенольных соединений с использованием современных методов анализа, применяемых в фармации, в том числе в современной фармакогнозии, а также разработка алгоритма исследования на примере видов трех родов, произрастающих на территории РФ, в том числе на Северном Кавказе, таких как *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L.

Степень разработанности темы исследования. Исследования Рязановой Т.К. были сфокусированы на создании единой концепции, которая включает принципы выбора метода и системного подхода к анализу лекарственных растений и продуктов их переработки (ЛРС и ЛРП). Основной целью исследований являлась разработка технологии получения фармакопейных стандартных образцов для оценки качества ЛРС и ЛРП. Важным аспектом являлась также подготовка нормативной документации по качеству ЛРС и ЛРП, учитывались современные данные о химическом составе, методологических подходах к анализу изучаемых растений и продуктов их переработки. Обеспечение соблюдения принципов системного подхода и соответствие нормативным документам по качеству фармакопейных стандартных образцов - одна из основных задач исследований (Куркин В.А., Рязанова Т.К.). Рязанова Т.К. для определения арбутина в ЛРС и ЛРП предлагала метод ВЭЖХ.

Учеными ведутся исследования по изучению растений семейства Вересковые флоры Сибири, Дальнего Востока (Белоусов М.В., 2004), Европейской части России (Фурса Н.С., Таланов А.А., 2010). Так, Белоусов М.В. (2004) установил химический состав и фармакологическую активность для некоторых растений семейства Вересковые флоры Сибири, а Таланов А.А. для голубики болотной флоры Европейской части страны, однако значительное количество видов флоры Кавказа до сих пор является малоизученными.

Изучение морфологических, биологических особенностей и изменчивости некоторых видов рода черноголовки в зависимости от экологических условий произрастания на среднем и южном Урале является актуальной задачей (Болотник Е.В., 2018) и в Сибири (Дмитрук С.И., 1989). Виды рода, произрастающие на Кавказе, ранее не изучались.

Исходя из вышеизложенного, прослеживается фрагментарный и зачастую разрозненный характер химических и фармакологических исследований. Кроме того, химический состав охваченных в нашем исследовании объектов значительно отличался в работах разных исследователей, вследствие чего выявленный одними исследователями вид фармакологической активности не подтверждался в других работах.

Стоит отметить, что исследуемые объекты имеют единую химическую общность (фенольные соединения) и виды фармакологического действия.

Уделяя внимания химическому составу, авторы только в редких случаях обращали внимания на показатели, характеризующие подлинность и качество сырья исследуемых объектов.

Актуальным является разработка методологического подхода к стандартизации фармакопейных и нефармакопейных видов ЛРС (на примере видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L.), содержащего преимущественно фенольные соединения (флавоноиды, фенилпропаноиды, простые фенолы), с последовательным применением современных инструментальных возможностей, а также обосновать объективные показатели качества лекарственного сырья, содержащих данную группу БАС.

Цель исследования – экспериментально-теоретическое обоснование методологических подходов к стандартизации ЛРС, содержащего фенольные соединения, на примере некоторых видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. и выявление перспектив использования их в фармации.

Для реализации поставленной цели необходимо решить следующие задачи:

1. Провести анализ научной литературы по химическому составу и фармакологической активности растений родов *Arctostaphylos* Adans. (толокнянка обыкновенная и толокнянка кавказская), *Vaccinium* L. (брусника обыкновенная, черника обыкновенная, черника кавказская, голубика обыкновенная и клюква болотная) и *Prunella* L. (черноголовка обыкновенная, черноголовка крупноцветковая и черноголовка разрезная).

2. Научно обосновать целесообразность использования современных методов определения подлинности для исследуемых видов ЛРС (люминесцентная микроскопия, тонкослойная хроматография (ТСХ) и ДНК-штрихкодирование), установить их диагностические признаки на примере сырья некоторых видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L.

3. Исследовать фенольные соединения видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. с использованием современных физико-химических методов анализа. Определить ведущую группу БАС и ее доминирующий компонент.

4. Определить количественное содержание полисахаридных фракций (водорастворимые полисахариды и пектиновые вещества) и их мономерный состав для видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L.. Для выделенных полисахаридов установить физико-химические константы (среднюю молекулярную массу, поверхностная активность, изоэлектрическая точка, коэффициент распределения и для ПВ сорбционная способность).

5. Установить содержание белкового, аминокислотного и элементного состава в сырье родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L.

6. Научно обосновать на примере некоторых образцов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. возможность использования метода капиллярного электрофореза для анализа сырья, содержащего арбутин, хлорогеновую и розмариновую кислоту, а также флавоноида – гиперозида. Разработать и валидировать для каждого ЛРС методики количественного определения основных групп БАС с учетом исследуемых современных подходов в аналитической химии. Разработать методики анализа определения ведущей группы БАС по суммарному содержанию и с помощью сепарационного метода доминирующий компонент.

7. Установить показатели качества для внесения в ФС и проекты ФС в раздел «Испытания» для образцов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L., а также определить оптимальные режимы сушки и сроки годности на предлагаемые виды ЛРС.

8. В соответствии с современными требованиями разработать проекты ФС для внесения в ГФ РФ XIV издания (толокнянки обыкновенной листья, брусники обыкновенной листья) и предложить проекты на новые виды сырья родов *Vaccinium* L. и *Prunella* L.

9. Исследовать виды фармакологической активности извлечений, полученных из сырья родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L.

10. Разработать методологический подход и предложить алгоритм изучения растений, содержащих в качестве ведущей группы БАС – фенольные соединения. Научно обосновать критерии подлинности и качества ЛРС с использованием современных методов анализа.

Научная новизна. Впервые с использованием разных видов микроскопического анализа (стерео-, люминесцентная микроскопия, микроскопия в проходящем свете) определены показатели подлинности ЛРС, заключающиеся в комплексе диагностических признаков: для родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. *Prunella* L. по наличию и характеру люминесценции на листовой пластинке трихом, млечников, сети жилок, черешка и кутикулы, а также анатомо-диагностических признаков дополнительно черешка листа для всех исследуемых видов ЛРС, для клюквы болотной – побегов и плодов и для видов черноголовки – стеблей, цветков и семян.

Впервые для исследуемых видов предложен метод ТСХ для внесения в раздел ГФ РФ на ЛРС «Определение основных групп биологически активных веществ», предусматривающий в качестве СО диагностическое, доминирующее соединение. Впервые для исследуемых видов предложен метод секвенирования генома как альтернативный и объективный метод, с помощью которого были выявлены внутривидовые участки ДНК.

Впервые для исследуемых видов предложена схема выделения фенольных соединений и полисахаридного комплекса (водорастворимых полисахаридов и пектиновых веществ) с детальным установлением их компонентного состава. Впервые изучен белковый (в том числе аминокислотный) и элементный состав. Для всех образцов, заготовленных во флоре Северного Кавказа, фитохимический анализ проведен впервые.

Из листьев брусники обыкновенной выделены 27 соединений, 3 из которых являются новыми – 2',6'-ди-О-кофеил-арбутин (вакцинизид А), кверцетин-3-О-{2''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}- α -L-рамнопиранозид (вакцинизид В) и кверцетин-3-О-{2''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)-4''-О-(3''''-гидрокси-3''''-метилглутароил)}- α -L-рамнопиранозид. Из побегов данного растения выделено 17 соединений, 3 из которых являются новыми: катехин-О-гликозидами, (-)-эпикатехин-3-О- α -L-рамнопиранозид (вакцинизид D), (+)-катехин-3-О-{4''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}- α -L-рамнопиранозид (вакцинизид E) и (+)-катехин-3-О-(2'',4''-ди-О-галлоил)- α -L-рамнопиранозид (вакцинизид F). Впервые из травы черноголовки обыкновенной, черноголовки крупноцветковой и черноголовки разрезной, заготовленной во флоре Северного Кавказа, было выделено 18 соединений, 1 из которых является новым – кверцетин-3-О-(4''-ксилозил-6''-рамнозил)-глюкозид.

Впервые для полисахаридного комплекса (ВРПС и ПВ), выделенного из исследуемых объектов, определены физико-химические константы (средняя молекулярная масса, изоэлектрическая точка, коэффициент распределения, поверхностная активность, сорбционная способность).

Впервые для всех исследуемых видов ЛРС были разработаны, валидированы и предложены методики количественного определения суммы фенологликозидов, фенолокислот и флавоноидов (УФ- спектроскопия) и основного по содержанию компонента в сумме (метод КЭ).

Впервые определены для исследуемых видов ЛРС (за исключением толокнянки обыкновенной листьев, брусники обыкновенной листьев) режимы сушки, показатели качества сырья и сроки годности.

Впервые для внесения в ФС ГФ РФ XIV издания на толокнянки обыкновенной листья и брусники обыкновенной листья предложена спектрофотометрическая методика (взамен титриметрического метода) определения арбутина. Впервые разработаны проекты ФС на сырье «Черники листья», «Голубики обыкновенной листья», «Клюквы болотной побеги» и «Черноголовки трава».

Впервые проведен первичный скрининг извлечений полученных из исследуемых видов ЛРС с использованием различных экстрагентов, таких как вода очищенная, спирт этиловый 40%, спирт этиловый 70% и спирт этиловый 96%. Впервые в результате фармакологических исследований был сделан вывод, что извлечения из вышеперечисленных образцов обладают поливалентным профилем активности, зависящим, прежде всего, от выбора экстрагента и, соответственно, извлекаемой группы веществ.

Научная новизна исследования подтверждена патентом РФ на изобретение № 2794752 (от 24.04.2023) «Биологически активная добавка, обладающая актопротекторной активностью».

Теоретическая и практическая значимость. Проведенные исследования некоторых видов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. перспективны для дальнейшего внедрения в медицинскую практику в качестве ЛРС источников, содержащих в качестве ведущей группы БАС - фенольные соединения. Данные исследования будут способствовать увеличению сырьевой базы за счет близкородственных видов растений, а также расширению номенклатуры эффективных отечественных лекарственных препаратов.

Получены новые сведения по химическому составу исследуемых объектов. В результате проведенных исследований разработано 6 проектов ФС: «Толокнянки обыкновенной листья», «Брусники обыкновенной листья», «Черники листья», «Голубики обыкновенной листья», «Клюквы болотной побеги» и «Черноголовки травы», предоставленные в компанию «Марьян Луг» ИП Повышева.

Внедрение в практику. В ходе исследования были разработаны методики определения подлинности и качества ЛРС, а также обоснованы предельные значения показателей качества для изучаемых объектов «Толокнянки обыкновенной листья», «Брусники обыкновенной листья». Данные результаты вошли в проекты ФС, которые внесены в ГФ РФ XIV издания. Также установлены нормы показателей качества, которые вошли в проекты ФС на «Черники листья», «Голубики обыкновенной листья», «Клюквы болотной побеги» и «Черноголовки травы» (компании «Марьян Луг» ИП Повышева). На все вышеперечисленные виды ЛРС разработаны

инструкции по сбору и сушки, которые утверждены в Перкальском дендрологическом парке Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН (БИН РАН).

Результаты диссертационного исследования находят применение в учебной работе, используются в учебном процессе на кафедре фармацевтической химии и фармацевтической технологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Воронежский государственный университет», а также для входного контроля качества ЛРС на фармацевтическом производстве ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО».

Методология и методы исследования. Основой данного исследования является поиск, анализ и систематизация литературных данных, связанных с исследованием растений родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L., содержащих фенольные соединения в качестве ведущей группы БАС; изученность химического состава; фармакологических видов активности; подходов к методам стандартизации; разработки нормативной документации. На основе полученных данных обобщены и представлены выводы, которые определяют теоретическое и практическое значение данного диссертационного исследования.

При выполнении комплексных фармакогностических исследований использовались хроматографические (ВЭЖХ, ТСХ, колоночная хроматография (КХ), бумажная хроматография (БХ) и ионообменная хроматография), физико-химические (оптическая микроскопия, спектрофотометрия, КЭ, ЯМР-спектроскопия и масс-спектрометрия, вискозиметрия, кондуктометрия, атомно-эмиссионная спектрометрия, титрование), генетические (ДНК-штрихкодирование), фармакологические и статистические методы анализа.

Установленные морфолого-анатомические признаки с применением стерео- и люминесцентной микроскопии, а также ДНК-штрихкодирование позволят безошибочно определять видовую принадлежность ЛРС как в цельном и измельченном, так и порошкованном сырье.

Выявленные фармакологические свойства (включая антиоксидантную, нейропротекторную, диуретическую, актопротекторную и антигиперлипидемическую активность) для экстрактов, полученных из исследуемых видов лекарственных растений, являются основой для дальнейших более глубоких биологических исследований.

Разработанный методологический подход, представленный в виде алгоритма исследования фармакопейных и нефармакопейных растений, содержащих в качестве основных групп БАС преимущественно фенольные соединения, будут рассматриваться для изучения перспективных для фармации растений, содержащих не только фенольные соединения, с последующей стандартизацией их сырья при внедрении в фармацевтическую практику.

Разработка методологии исследования базировалась на поиске и анализе литературных данных, степени изученности, актуальности темы, формулировании цели и задач исследования и состоял из следующих этапов: I этап – определение мест естественного произрастания производящего растения, сбор его сырья, внесение гербарного образца (подписанный флористом с присвоенным ваучерным номером) в электронную базу; II этап - установление показателей подлинности ЛРС в соответствии с требованиями Государственной фармакопеи РФ (показатели подлинности по внешним и микроскопическим признакам с использованием стерео- и люминесцентной микроскопии; для растений, имеющих близкородственные виды или способных образовывать гибридные формы, используется ДНК-штрихкодирование; метод ТСХ используется для определения подлинности по характеру, наличию пятен и значению R_f на хроматографической пластинке); III этап – определение времени сбора ЛРС и обоснование способа и режимов сушки; IV этап – установление химического состава фармакопейных и нефармакопейных растений с обоснованным и последовательным использованием современных инструментальных методов анализа; V этап – разработка методик качественного и количественного содержания БАС с последующим мониторингом фармакологической активности для сырья содержащего фенольные соединения; VI – выделение и установление структуры соединений, ранее не описанных в литературе, при помощи колоночной хроматографии с использованием методов ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-ДМД, масс-спектрометрии, спектрокопии ЯМР, ИК-спектрометрии (при необходимости подвергают стандартизации и рекомендуют в качестве стандартных фармакопейных образцов с последующим мониторингом

фармакологической активности); VII этап – установление показателей качества ЛРС (влажность, зола общая, зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте, содержание экстрактивных веществ, срок годности, условия сушки и заготовки) с использованием современных инструментальных методов анализа для внесения в проект ФС; VIII этап – определение количественного содержания биополимеров - полисахаридов и белков как основных компонентов экстракционных лекарственных форм с последующим анализом их компонентного состава и установлением физико-химических констант; IX этап – определение качественного и количественного состава других классов БАС с использованием методов ТСХ, ГХ, ВЭЖХ, СФ и КЭ. При обнаружении новых соединений, ранее не описанных в литературе, выделяют их методом КХ и устанавливают структуру с использованием методов ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-ДМД, масс-спектрометрии, спектроскопии ЯМР, ИК-спектрометрии (при целесообразности подвергают стандартизации и рекомендуют в качестве стандартных фармакопейных образцов с последующим исследованием фармакологической активности).

Положения, выдвигаемые на защиту:

- Результаты исследования и установления морфолого-анатомических признаков ЛРС с помощью стерео-, люминесцентной микроскопии и микроскопии в проходящем свете.
- Результаты подобранных условий методом ТСХ для определения основных групп БАВ по доминирующему компоненту.
- Результаты фитохимического исследования изучаемых объектов (фенольный и полисахаридный комплекс, содержание белка и его аминокислотного состава, а также элементного состава).
- Результаты исследования физико-химических констант полисахаридов (ВРПС и ПВ), включая среднюю молекулярную массу, поверхностную активность, изоэлектрическую точку, коэффициент распределения и сорбционную способность, были получены для всех объектов, изучаемых в данном исследовании.
- Методики определения качественного и количественного содержания основных классов БАС с целью определения качества ЛРС и внесения в ФС ГФ РФ или в проект ФС.
- Результаты изучения режимов сушки и сроков годности ЛРС.
- Разработанные проекты ФС и инструкции по сбору и сушке на ЛРС видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. .
- Результаты проведенного первичного фармакологического скрининга извлечений, полученных из всех исследуемых объектов.

Степень достоверности. Полученные результаты в ходе экспериментальной работы, сформулированные выводы и практические рекомендации базируются на достаточном объеме выполненных исследований, реализованных на оборудовании, которое имеет соответствующие сертификаты и свидетельства о поверке. Достоверность результатов подтверждена соответствующими графиками, таблицами и рисунками. Разработанные методики валидированы, полученные результаты статистически обработаны, согласно требованиям действующей нормативной документации с использованием программы «Microsoft Excel 2016». Проанализирован значительный объем литературных источников как отечественных, так и на иностранных языках, а также ФС из ГФ РФ и других стран.

Апробация работы. Основные результаты диссертационной работы доложены на следующих конференциях: Всероссийской научно-практической конференции «Фармакогностическое и ботаническое изучение лекарственных растений», посвященной памяти заслуженного деятеля науки РФ, доктора фармацевтических наук, профессора Д.А. Муравьевой (г. Пятигорск, 2015 г); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 50-летию фармацевтического факультета КГМУ «Фармацевтическое образование, наука и практика: горизонты развития» (г. Курск, 2016 г); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 95-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РФ, доктора фармацевтических наук, профессора Д.А. Муравьевой (г. Пятигорск, 2017 г); Международной научной конференции «90 лет – От растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы» (г. Москва, 2021 г); Всероссийской научно-практической онлайн-конференции с международным участием «Фармацевтическое

образование СамГМУ история, современность, перспективы», посвященной 50-летию фармацевтического образования СамГМУ (г. Самара, 2021 г); международной научно-практической конференции, посвященной 100-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РФ, профессора, доктора фармацевтических наук Д.А. Муравьевой (г. Пятигорск, 2022 г); 8-й международной научно-методической конференции «Фармообразование 2022» «Пути и формы совершенствования фармацевтического образования. Актуальные вопросы разработки и исследования новых лекарственных средств» (г. Воронеж, 2022 г); международной научной конференции «Университетская наука: взгляд в будущее», посвященной 87-летию Курского государственного медицинского университета (г. Курск, 2022 г); VIII международной научной конференции «Актуальные проблемы медицинской науки и образования» (г. Пенза, 2022); международной научно-практической конференции, посвященной памяти заслуженного деятеля науки РФ, профессора, доктора фармацевтических наук Д.А. Муравьевой (г. Пятигорск, 2023 г); научно-практической конференции «Гаммермановские чтения» (г. Пермь, 2023); международной научно-практической конференции, посвященной памяти заслуженного деятеля науки РФ, профессора, доктора фармацевтических наук Д.А. Муравьевой (г. Пятигорск, 2024 г).

Связь исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательской работы Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России (г. Пятигорск).

Публикации. Результаты, полученные в ходе экспериментальной работы и вошедшие в диссертацию, отражены в 21 опубликованной печатной работе, в том числе 21 статье - в журналах из списка ВАК, 8 статей в базе данных Scopus; в том числе 12 статей в журналах, которые включены в международные базы данных (МБД). Получен 1 патент на изобретение: «Биологически активная добавка, обладающая актопротекторной активностью».

Личный вклад автора. Автором выбрано научное направление, проведены экспериментальные исследования, а также обобщены и аргументированы полученные данные. Результаты исследований были опубликованы, и автор сыграл главную роль в подготовке и написании научных работ с соавторами. Более того, автор успешно внедрил результаты своей диссертационной работы.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертационной работы соответствует шифру специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты, полученные в ходе выполнения экспериментальной работы, соответствуют области специальности, пунктам 2, 3 и 6 паспорта специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа включает 9 глав, изложенных на 384 страницах печатного текста, проиллюстрировано 109 рисунками, содержит 167 таблиц, состоит из введения, обзора литературы, главы «Объекты и методы исследования», 7 глав собственных исследований, заключения, общих выводов, списка литературы, представленного 458 источниками, в том числе 299 на иностранном языке; приложение изложено на 208 страницах печатного текста, проиллюстрировано 184 рисунками, содержит 37 таблиц.

Введение включает в себя актуальность выбранной темы диссертационной работы, определение цели и формулировку задач исследования, отражение научной новизны и практической значимости исследования, а также обозначение основных положений, которые будут выдвинуты на защиту. Введение также включает описание методологии и методов исследования, информацию о публикациях и апробации работы.

Глава 1 – Обзор литературы сформирован на основе данных отечественных и зарубежных авторов, в которой отражено современное состояние изученности представителей родов *Arctostaphylos* Adans. (толокнянка обыкновенная, толокнянка кавказская), *Vaccinium* L. (брусника обыкновенная, голубика обыкновенная, черника обыкновенная, черника кавказская, клюква болотная) и *Prunella* L. (черноголовка обыкновенная, черноголовка крупноцветковая, черноголовка разрезная), в которой описана ботанико-таксономическая характеристика видов представленных родов, их химический состав, методы анализа БАС и фармакологическая активность.

Глава 2 содержит информацию об объектах исследования и использованных методах исследования.

В **главе 3** представлены исследования по установлению показателей подлинности макро- и микроскопическими методами анализа с использованием стерео- и люминесцентной микроскопии, а также представлены данные, полученные в результате ДНК-штрихкодирования исследуемых образцов. Для раздела «Определение основных групп биологически активных веществ» разработаны методики на основе ТСХ по основному содержанию в смеси фенольных соединений компоненту.

Глава 4 содержит результаты фитохимического исследования ЛРС, в которой отражен компонентный состав основной группы БАС – фенольные соединения.

В **главе 5** результаты исследования биополимеров (полисахариды и белки), как естественных БАС экстракционных лекарственных форм, а также сведения об их компонентном составе, физико-химических константах (полисахаридов), которые имеют значения при разработке лекарственной формы. Представлены сведения о качественном и количественном содержании минерального состава ЛРС.

В **главе 6** изложены методы количественного анализа по сумме веществ (фенологликозиды, флавоноиды и фенилпропаноиды) и основному по содержанию компоненту методом КЭ (полученные результаты подтверждены методом ВЭЖХ). Для разработанных методик были определены валидационные параметры, рекомендуемые ГФ РФ XIV издания.

Глава 7 включает в себя установленные для каждого вида ЛРС обязательные нормы качества для внесения в проект ФС, сроки годности и режимы консервации (сушки) анализируемых образцов.

В **главе 8** представлены фармакологические исследования извлечений, полученных из сырья видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L.

Глава 9 содержит методологию в виде алгоритма с кратким описанием этапов анализа лекарственных растений и их сырья, содержащих преимущественно фенольные соединения.

Диссертация завершается заключением и списком литературы.

В **приложениях** представлены ареалы произрастания и описание производящих растений, фотографии гербарных образцов и ЛРС, микрофотографии исследуемых объектов, ВЭЖХ хроматограммы, электрофореграммы, графические диаграммы, таблицы с расчетами, спектральные характеристики ЯМР-, ¹H- и ¹³C- выделенных соединений. В приложении 8 представлены акт внедрения на проекты ФС (компания «Марьин Луг» ИП Повышева), инструкции по сбору и сушке ЛРС (утвержденные в Перкальском дендрологическом парке Ботанического института им. В.Л. Комарова РАН), акты о внедрении результатов научной и инновационной деятельности в ФГБОУ «Воронежский государственный университет» и на фармацевтическом производстве ООО «КОМПАНИЯ «ДЕКО». Подтверждение от ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России о соавторстве в разработке Фармакопейных статей ФС.2.5.0063.18 «Брусники обыкновенной листья» и ФС.02.5.0099.18 «Толокнянки обыкновенной листья».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1. Объекты и методы исследования

Объектами исследования были фармакопейные виды лекарственного растительного сырья (ЛРС): брусники обыкновенной листья и толокнянки обыкновенной листья, а также нефармакопейные виды ЛРС: голубики обыкновенной листья, клюквы болотной побеги, черники обыкновенной и черники кавказской листья, толокнянки кавказской листья, видовую принадлежность которой устанавливали методом секвенирования генома. Из рода *Prunella* L. в исследовании использовали траву трех видов: черноголовки обыкновенной, черноголовки крупноцветковой, черноголовки разрезной. Каждый вид был заготовлен из 5 мест естественного произрастания. Видовую принадлежность всех собранных образцов сырья подтвердили д-р биол. наук Гончаров М.Ю. (ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России) и канд. биол. наук Шильников Д.С. (БИН РАН). Образцам, используемым в сквозном анализе, а именно при разработке методик

оценки подлинности и испытаний, а также в фармакологическом исследовании, были присвоены ваучерные номера при монтировке гербария.

Сушку сырья проводили воздушно-теневым способом, а также с использованием ИК-сушильного шкафа и конвективной принудительной сушки. Влияние способа консервации на стабильность количественного содержания фенольных соединений определяли согласно валидированным методикам. Анализ фенольных соединений проводили на жидкостном хроматографе LCMS-8050 (Shimadzu, Columbia, MD, США), соединенный с фотодиодно-матричным детектором (ФДМД) и 3q-детектором с ионизацией электрораспылением (ESI/МС) и колонкой GLC Mastro C18 (150 mm × 2,1 mm × 3 μm; Shimadzu, Kyoto, Япония) в градиентном режиме. Эксперимент проводили согласно методикам. Анализ мономерного состава полисахаридных комплексов проводили после кислотного гидролиза каждого образца в среде трифторуксусной кислоты и последующей предколоночной дериватизацией 1-фенил-3-метил-5-пиразолоном (ФМП) на жидкостном хроматографе Agilent 1260 Infinity LC (Agilent Technologies, США) со спектрофотометрическим детектором и колонкой Gemini NX-C18 (150×4,6 мм, 5 мкм с размером пор 110 Å; Phenomenex, США) в градиентном режиме. Разработку методик оценки подлинности методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) проводили путем подбора оптимальной элюирующей системы, состав которого подбирали в соответствии с выбранным маркерным соединением с использованием литературных данных. Валидацию разработанных методик проводили по показателям специфичность, робастность (устойчивость), воспроизводимость. ВЭЖХ метод использовался для определения состава аминокислот в образцах ЛРС с предварительным выделением сырого протеина согласно ГОСТ 32195 – 2013 (ISO 13903:2005). Анализ проводили на автоматическом анализаторе аминокислот AAA 400 с пост-колоночной дериватизацией разделенных аминокислот нингидрином.

Количественное определение суммы фенольных соединений и флавоноидов проводили на спектрофотометре СФ-2000 в УФ- и видимом диапазоне (200-400 нм и 300-500 нм). Испытуемые извлечения и растворы сравнения помещали в кварцевые кюветы с толщиной слоя поглощения 1 см. Обработку спектров поглощения проводили в программе сканирования для спектрофотометра СФ-2000 (версия 4.06). Идентификацию и количественное определение доминирующих компонентов проводили на системе капиллярного электрофореза «КАПЕЛЬ®-105М» с кварцевым капилляром с диаметром капилляра 75 мкм, $L_{общ}/L_{эф} = 50/60$ см. Ведущие электролиты готовили согласно ГОСТ 4919.2-2016.

Анатомический анализ образцов ЛРС проводили согласно требованиям ГФ РФ XIV издания (ОФС.1.5.3.0003.15). В качестве просветляющей жидкости использовали водный раствор натрия гидроксида 3% и раствор хлоралгидрата. Полученные микропрепараты изучали на микроскопе люминесцентном Микромед 3 ЛЮМ и микроскопе биологическом Микромед 1 (вар. 3-20). Фотографии получали с помощью видеоокуляра НУ-1139 в программе НАУЕАR. Автолюминесценцию образцов сырья наблюдали на микроскопе люминесцентном Микромед 3 ЛЮМ в спектральном диапазоне возбуждения люминесценции 410-550 нм. Признаки сырья исследуемых видов исследовали также с помощью микроскопа Olympus SC50 (OLYMPUS CORPORATION, Япония) и камеры Levenhuk C310 NG (Levenhuk, Inc., США).

Вискозиметрический метод использовали для определения молекулярной массы и изоэлектрической точки полисахаридных фракций. Кондуктометрический метод использовали для определения способности полисахаридных макромолекул к проникновению через клеточную мембрану на модели жидкость-жидкостной экстракции между неполярным растворителем – этилацетатом – и полярным растворителем – водой очищенной. Те же растворы полисахаридных фракций, для которых определяли вязкость и далее рассчитывали среднюю молекулярную массу, использовали для определения наличия поверхностной активности с помощью сталагмометра Траубе и прибора Ребиндера. Адсорбционную способность пектиновых веществ устанавливали на примере сорбции метиленового синего. Также проводили определение сорбционной способности коммерческих образцов энтеросорбентов как препаратов сравнения – Полисорб МП, Активированный уголь, Неосмектин®, Альфасорб® - в тех же условиях, что и для ПВ.

Минеральный состав золы общей, полученной после сжигания воздушно-сухого сырья ЛРС согласно методике ГФ РФ XIV издания, устанавливали методом атомно-эмиссионной спектроскопии на дифракционном спектрографе ДФС-8-1.

Сравнительное изучение маркерных участков генома хлоропластов проводили в несколько этапов: выделение ДНК, полимеразная цепная реакция (ПЦР) с использованием праймеров, амплификация, секвенирование с последующей обработкой результатов в программе MEGA 5.2.2.

Фармакологическая часть исследования включала определение нейропротекторной, диуретической, антигипертензивной, актопротекторной, антиоксидантной активности.

Исследование проводили с сухими экстрактами после концентрирования извлечений, полученных согласно схемам:

1) *диуретическая, антиоксидантная, антигипертензивная, нейропротекторная активность*: для оценки активности получали сухие экстракты путем экстракции сырья водой и водно-спиртовым этанолом (спирт этиловый 40 %, 70 % и 95 %);

2) *актопротекторная активность*: сухие экстракты из травы видов черноголовки получали путем экстракции сырья водой очищенной.

Исследование выполнено на 107 мышах-самцах линии Balb/c массой 25-27 г. и 300 крысах-самцах линии Wistar массой 200-220 г. прошедших микробиологический контроль и двухнедельный карантин. Содержание и проводимые с животными манипуляции соответствовали общепринятым нормам экспериментальной этики (Directive 2010/63 / EU).

Оценка острой токсичности осуществлялась с использованием общепринятого метода определения токсичности химических субстанций в остром тесте – процедура «Up and Down». Основные положения данного метода представлены в Руководстве по оценке пероральной токсичности химических соединений № 425 Организации экономического сотрудничества и развития (OECD № 425).

Антирадикальные свойства исследуемых сухих экстрактов изучали в два этапа: *in vitro* на модельных средах генерации DPPH, супероксид и гидроксил радикалов, и *in vivo* по определению в сыворотке крови животных изменения активности ферментов эндогенной антиоксидантной защиты: супероксиддисмутаза (СОД), глутатионпероксидаза (ГП) и каталазы (КАТ), а также концентрации ТБК-активных продуктов (ТБК-АП) в пересчете на малоновый диальдегид. Полученные сухие экстракты, растворенные в спирте этиловом 70 %, вносили в среду инкубации в следующем диапазоне концентраций: 1000 мкг/мл, 500 мкг/мл, 250 мкг/мл, 125 мкг/мл и 62,5 мкг/мл. При проведении *in vitro* исследования в качестве положительного контроля использовали кверцетин в аналогичном диапазоне концентраций. В *in vivo* тестировании крысы-самцы линии Wistar содержались в стандартных условиях вивария с соблюдением требований международных норм экспериментальной этики (Directive 2010/63/EU). Исследуемые сухие экстракты вводили животным в дозе 100 мг/кг (*per os* в виде водной суспензии). На данном этапе в качестве референтного соединения использовали кверцетин в дозе 100 мг/кг, вводимый по аналогичной исследуемым сухим экстрактам схеме.

Нейропротекторная активность. Эксперимент выполнен на 90 крысах-самцах линии Wistar массой 220-240 г. полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово». Содержание и манипуляции, проводимые с животными, соответствовали положениям Directive 2010/63 / EU. Оценку активности проводили на модели перманентной фокальной ишемии головного мозга, где в качестве референта использовали стандартизованный экстракт гинкго билоба (EGB761) в дозе 35 мг/кг. Вводимая доза для изучаемых извлечений была выбрана на основании ранее проведенных исследований и составила 50 мг/кг. Оценивали скорость мозгового кровотока, размер зоны некроза определяли трифенилтетразолиевым методом. Определение концентрации лактата проводили с использованием стандартного набора реактивов «Арбис+» в сыворотке крови методом энзиматической колориметрии.

Антигипертензивная активность. Сухие экстракты анализируемых извлечений растворяли в диметилсульфоксиде до получения раствора с конечной концентрацией 1000 мкг/мл. Далее готовили серии двукратных разведений маточного раствора с диапазоном концентрации производного 2-амино-4,5,6,7-тетрагидро-1-бензотиофен-3-карбоксамиды: 500 мкг/мл; 250

мкг/мл; 125 мкг/мл и 62,5 мкг/мл. В качестве референтов использовалась койевая кислота, полученная от Hunan Warrant pharmaceuticals (КНР) в том же диапазоне концентраций.

Тесты выполнялись в триплетном варианте. IC₅₀ мкг/мл рассчитывали методом пробит-анализа.

Диуретическая активность. Сухие экстракты растворяли в воде очищенной и вводили животным из расчета 100 мг/кг, референтные препараты – фуросемид в дозе 10 мг/кг и спиронолактон в дозе 25 мг/кг. Эксперимент включал определение концентрации ионов кальция, натрия, магния и калия в сыворотке крови.

Актопротекторная активность. Влияние экстрактов на уровень физической работоспособности животных проводили при однократном введении 100 мг/кг в эксперименте «принудительное плавание». Препарат сравнения – настойка женьшеня в дозе 1 мл/кг.

Результаты экспериментов подвергали анализу статистическими методами, рекомендуемыми ГФ РФ XIV издания. Расчет статистических параметров проводили в Microsoft Excel 2016 согласно требованиям ГФ РФ XIV издания. Результаты фармакологических испытаний статистически обрабатывали и выражали в виде M±SEM. Сравнение групп средних осуществляли методом ANOVA с пост-обработкой Ньюмена-Кейсла при p<0,05. В работе применяли программный пакет статистического анализа «STATISTICA 6.0» (Stat Soft, США).

2. Установление показателей подлинности сырья видов родов *Arctostaphylos Adans.*, *Vaccinium L.* и *Prunella L.*

2.1. Морфологические и анатомические признаки видов родов *Arctostaphylos Adans.*, *Vaccinium L.* и *Prunella L.*

Одними из основных показателей подлинности ЛРС является детальное описание морфолого-анатомических признаков, комплекс которых позволяет безошибочно сделать заключение о соответствии наименованию сырья, поступившего на анализ. При определении вышеуказанных признаков был использован метод люминесцентной и стерео-микроскопии, а также классический вариант микроскопии в проходящем свете.

Уже в ГФ РФ XIII издания внесен раздел «Определение основных групп биологически активных веществ», в котором наблюдается тенденция использования метода ТСХ, где рассматривается наличие основных и сопутствующих веществ, что впоследствии по их количеству и характеру является определением подлинности. Литературные данные свидетельствуют об образовании гибридных форм видов внутри изучаемых родов. В подобных случаях не всегда возможно сделать безошибочное заключение о подлинности. Нами была предпринята попытка использования одного из самых современных и эффективных методов определения подлинности ЛРС - молекулярно-генетический метод.

С использованием стереомикроскопии для рода *Arctostaphylos Adans.* были выявлены следующие диагностические признаки: листья толокнянки обыкновенной и толокнянки кавказской: кожистые, плотные с обеих сторон, по краю листа с мелкими трихомами, верхняя часть листа блестящая, голая; отчетливо заметна сеть жилок (рис. 1-1,2, 5,6). Край листовой пластинки и верхушка листа толокнянки кавказской загнуты на нижнюю сторону. Встречаются редкие железистые образования. Трихомы многочисленные, удлинённые, располагаются по краю листовой пластинки и на черешке (рис. 1-7,8). Люминесценция обеих поверхностей листа слабая, ткани верхней стороны толокнянки обыкновенной имеют желтовато-зеленый оттенок, толокнянки кавказской - желтовато-коричневое, по краю листа зеленоватое свечение (рис. 1-11,12). Наибольшее свечение характерно для жилок (рис. 1-10). Ткани черешка толокнянки кавказской люминесцируют красноватым оттенком (рис. 1-9). На нижней стороне листа обоих видов заметна яркая люминесценция устьичного аппарата (рис. 1-3,4, 10,12).

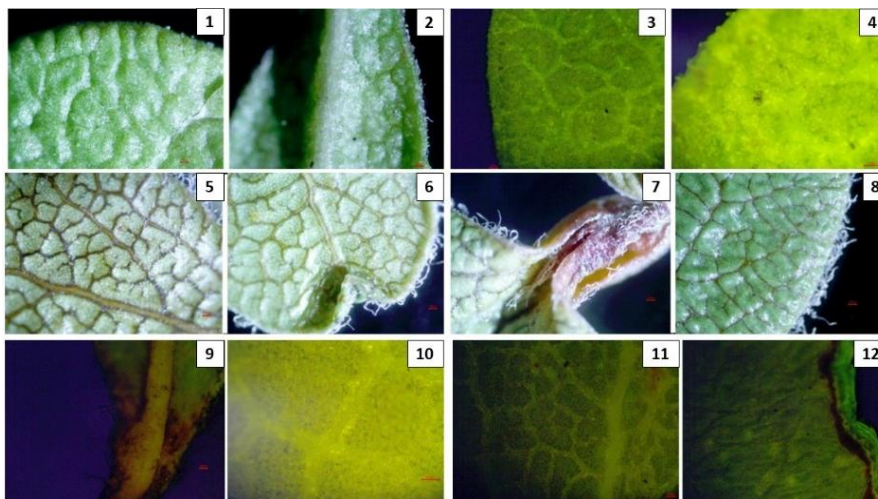


Рисунок 1 – Толокнянка обыкновенная: стереомикроскопия.

Обозначения: 1 - фрагмент верхней стороны листа ($\times 40$); 2 – фрагмент нижней стороны листа ($\times 40$); 3 – люминесценция верхней стороны листа ($\times 40$); 4 – люминесценция нижней стороны листа ($\times 40$); Толокнянка кавказская ($\times 40$): (стереомикроскопия) 5,6 – фрагменты нижней стороны листа ($\times 40$); 7,8 – фрагменты верхней стороны листа ($\times 40$); 9 – люминесценция черешка ($\times 40$); 10 – люминесценция нижней стороны ($\times 100$); 11 – люминесценция верхней стороны листа ($\times 40$); 12 - люминесценция нижней стороны ($\times 40$).

При сравнительной характеристике морфологических признаков толокнянки обыкновенной и толокнянки кавказской было выявлено, что присутствуют отличия только по обилию волосков на листовой пластинке.

Для брусники обыкновенной с помощью стереомикроскопии выявлено, что верхняя сторона листовой пластинки голая, блестящая, лишена трихом и покрыта кутикулой (рис. 2-1). Край листа загнут на нижнюю сторону, трихомы по краю листа отсутствуют. На нижней поверхности листа визуализируются железки коричневатого цвета (рис. 2-2). Черешок короткий, опушенный (рис. 2-3). Люминесценция тканей листа яркая, как снизу, так и сверху листовой пластинки. У основания листа и на черешке заметна желтоватая люминесценция редких трихом, железки имеют коричневую люминесценцию (рис. 2-4,5).



Рисунок 2 – Брусника обыкновенная: стереомикроскопия.

Обозначения: 1 – фрагмент верхней стороны листа ($\times 40$); 2 – фрагмент нижней стороны листа ($\times 40$); 3 – черешок листа ($\times 40$); 4 – люминесценция черешка листа ($\times 40$); 5 – люминесценция нижней стороны листа ($\times 40$).

Для черники обыкновенной с использованием стереомикроскопии установлено, что листовая пластинка тонкая, без кутикулы. Верхняя сторона листа голая, сеть жилок не выражена (рис. 3-2). Край листа слегка завернут на нижнюю сторону, также выделяется сеть жилок. Головчатые трихомы располагаются по краю листа и по жилкам нижней стороны листа, они имеют бесцветную прикрепляющую их к эпидермису одноклеточную ножку и многоклеточную головку с буровато-оранжевым содержимым (рис. 3-1). Черешок короткий, опушение отсутствует. Люминесценция тканей верхней стороны листа хорошо выражена, свечение желтовато-зеленого цвета. Отчетливо заметно яркое свечение жилок и оснований железистых трихом по кончикам зубцов по краю листа (рис. 3-3). Люминесценция тканей нижней стороны листа более выражена, что особенно заметно при рассмотрении свечения тканей жилок. Железистые трихомы имеют своеобразное свечение – основание люминесцирует ярким зеленоватым цветом, а головка имеет оранжевый или коричневатый оттенок (рис. 3-4).

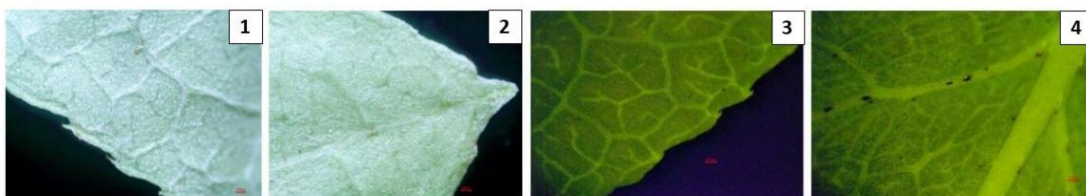


Рисунок 3 – Черника обыкновенная: стереомикроскопия.

Обозначения: 1 – фрагменты края нижней стороны листа ($\times 40$); 2 – верхней стороны листа ($\times 40$); 3 – люминесценция верхней стороны листа ($\times 40$); 4 – нижней стороны листа ($\times 40$).

При описании морфологических признаков черники обыкновенной листьев выявлено, что листовая пластинка тонкая, без кутикулы. Верхняя сторона листа опушена, трихомы простые белого цвета, располагаются по жилкам листа. Сеть жилок ярко выражена, жилки имеют желтовато-бурое окрашивание, предположительно, из-за наличия млечников. Край листа слегка завернут на нижнюю сторону (рис. 4-1), где также хорошо выделяется сеть жилок с редкими беловатого цвета простыми трихомами. Головчатые трихомы, располагающиеся по краю и по жилкам снизу листа, имеют бесцветную прикрепляющую их к эпидермису клетку и многоклеточную головку с буровато-оранжевым содержимым (рис. 4-2). Черешок короткий, густо опушенный (рис. 4-4). Люминесценция тканей верхней стороны листа не выражена, свечение коричневатое-зеленое цвета. Отчетливо заметно яркое зеленоватое свечение жилок и трихом. По кончикам зубцов по краю листа визуализируется зеленоватое свечение оснований железистых волосков и оранжевое выделительных клеток (рис. 4-5). Люминесценция тканей нижней стороны листа более выражена, зеленоватого цвета, жилки имеют желтовато-оранжевую люминесценцию. Отчетливо заметно свечение устьичного аппарата, как на верхней, так и нижней стороне (рис. 4-6).

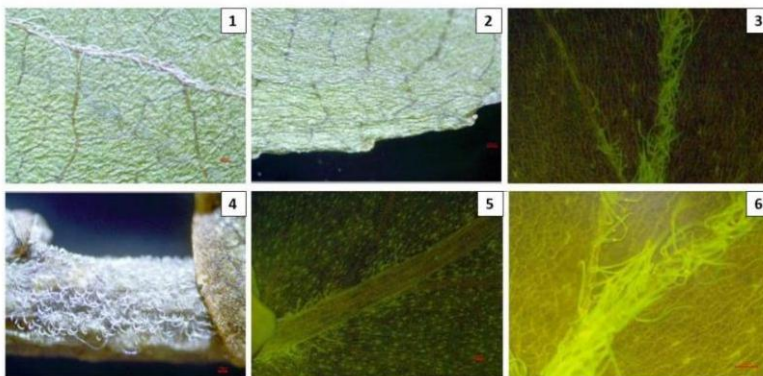


Рисунок 4 – Черника кавказская: стереомикроскопия.

Обозначения: 1 – фрагменты верхней стороны листа ($\times 40$); 2 – нижней стороны листа ($\times 40$); 4 – черешок листа ($\times 100$); 3 – люминесценция черешка листа ($\times 40$); 4 – верхней стороны листа; 5 – нижней стороны листа ($\times 100$).

С помощью стереомикроскопии листа голубики обыкновенной выявлено, что верхняя поверхность листа плотная, покрыта кутикулой (рис. 5-1). Жилки отчетливо выражены, более светлые, чем окраска листовой пластинки. Визуализируются редкие овальные образования, предположительно, железки (рис. 5-2). На нижней стороне листа голубики обыкновенной заметна сильная складчатость эпидермиса, отчетливо выделяются жилки (рис. 5-3). Край листа заворачивается на нижнюю сторону, по краю листа встречаются редкие трихомы (рис. 5-4). Также на нижней стороне визуализируются железки. При оценке люминесценции листа голубики обыкновенной следует отметить, что верхняя сторона листа имеет слабое свечение, в основном люминесцирует жилка листа (желто-зеленое свечение), на нижней поверхности свечение более выраженное (рис. 5-5). Железки имеют коричневое свечение (рис. 5-6).

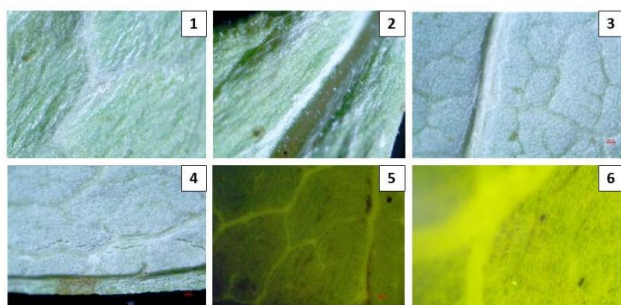


Рисунок 5 – Голубика обыкновенная: стереомикроскопия.

Обозначения: 1, 2 – фрагменты верхней стороны листа ($\times 40$); 3, 4 – фрагменты нижней стороны листа ($\times 40$); 5 – люминесценция верхней стороны листа ($\times 40$); 6 – нижней стороны листа ($\times 100$).

С помощью стереомикроскопии установлено, что на верхней стороне листа клюквы болотной имеется плотный слой кутикулы, край листа загнут книзу (рис. 6-1). Снизу листа слой кутикулы менее плотный, заметны многочисленные устьица. По краю листа встречаются мелкие головчатые трихомы с коричневатым содержимым. Жилки сильно выделяются на нижней стороне листа. У основания листа по краю визуализируются вытянутые простые трихомы (рис. 6-2). Черешки короткие, сильно загнутые, деревянистые. Люминесценция верхней и нижней сторон листа клюквы болотной слабая, наибольшим свечением обладают жилки листа (желто-зеленое и красновато-коричневое свечение) (рис. 6-3,4).

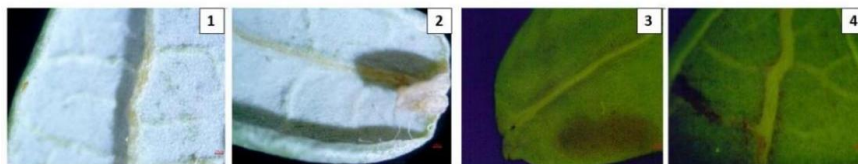


Рисунок 6 – Клюква болотная: стереомикроскопия.

Обозначения: 1 – фрагмент верхней стороны листа ($\times 40$); 2 – фрагмент нижней стороны листа ($\times 40$); 3 – люминесценция верхней стороны листа ($\times 40$); 4 – нижней стороны листа ($\times 40$).

Оценка морфологических особенностей черноголовки обыкновенной показала наличие на верхней стороне листовой пластинки редких простых волосков конусовидной формы (рис. 7-1). Край листа загнут на нижнюю сторону, по краю располагаются мелкие простые волоски (рис. 7-2). Жилки сильно вдавлены и выступают снизу листа, коричневатого цвета, где расположены простые многоклеточные волоски (3-7 клеток) (рис. 7-3). У некоторых волосков на нижней стороне листа одна или две клетки имеют спавшиеся стенки. Более интенсивное опушение наблюдается для молодых листьев. Черешок короткий, сильно опушен простыми волосками (рис. 7-4). Люминесценция тканей верхней стороны листа слабая, почти отсутствует, трихомы имеют яркое желто-зеленое свечение (рис. 7-5). При большем увеличении ткани приобретают желтовато-коричневую люминесценцию (рис. 7-6). На нижней стороне ткани листа имеют коричневатое свечение, жилка – желтовато-коричневое (рис. 7-7), трихом – желтовато-зеленое (рис. 7-8). Сравнительная характеристика видов рода *Vaccinium* L. представлена в таблице 1.

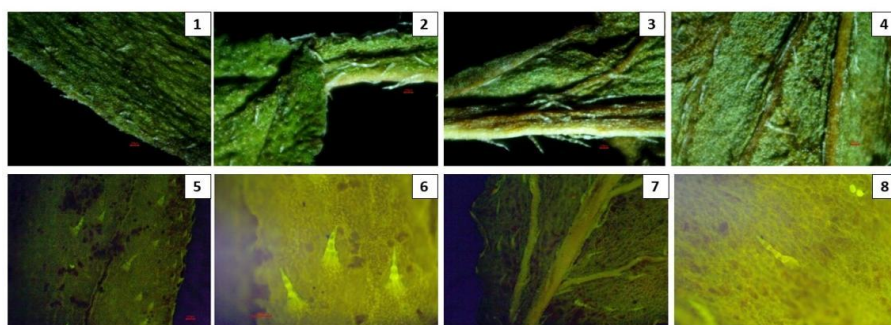


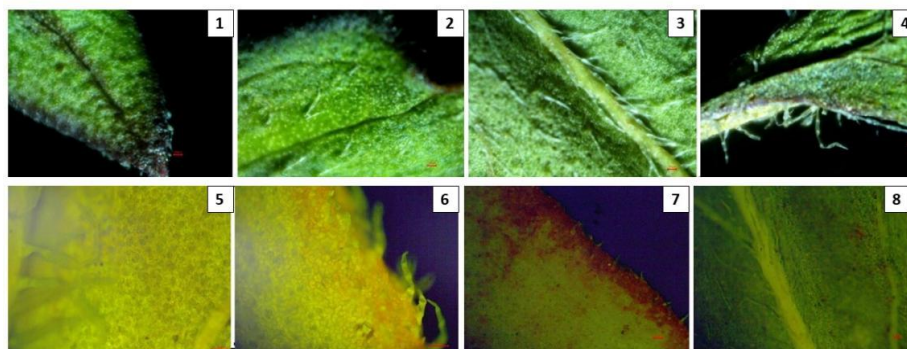
Рисунок 7 – Черноголовка обыкновенная: стереомикроскопия.

Обозначения: 1,2 – фрагменты верхней стороны листа ($\times 40$); 3,4 – нижней стороны листа ($\times 40$); 5,6 – люминесценция верхней стороны листа ($\times 40$); 7,8 – нижней стороны листа ($\times 40$).

Таблица 1 – Сравнительная характеристика морфологических признаков видов рода *Vaccinium* L

| Объект | <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. | <i>Vaccinium myrtillus</i> L. | <i>Vaccinium arctostaphylos</i> L. | <i>Vaccinium uliginosum</i> L. | <i>Vaccinium oxycoccus</i> L. |
|---------------------------------------|---------------------------------|--|---|--------------------------------|--|
| Кутикула | + | - | - | +/- | + |
| Сеть жилок | - | +↓ | + | +↓ | +↓ |
| Млечники | - | - | + | - | - |
| Железистые волоски | +↓ | +↓ | +↓ | +↓ | - |
| Простые волоски по краю | - | + | + | - | + |
| Простые волоски на черешке | + | - | + | + | + |
| Железистые волоски по краю | - | + | + | - | + |
| Простые волоски на поверхности | - | - | +↓↑ | +↑ | - |
| Люминесценция листовой пластинки | Желтая | Желтоватая, выражена снизу, трихомы желтая | Коричневая, выражена снизу, трихомы ярко желтая | Желтоватая, выражена снизу | Желтовато-зеленая, красноватая вдоль жилок |
| Люминесценция черешка | Желтая | Желтоватая | Ярко - желтая | Желтовато-коричневая | Желтоватая |
| Люминесценция выделительного аппарата | Коричневая | Оранжевая, коричневая | Оранжево - желтая | Коричневая | - |

При изучении внешних признаков черноголовки крупноцветковой, на верхней стороне листовой пластинки выявлены простые многочисленные трихомы с расширенным основанием (рис. 8-1). Край листа загнут на нижнюю сторону, по краю располагаются мелкие простые волоски. Жилки сильно вдавлены и выступают снизу листа, буроватого цвета, где расположено большое количество простых многоклеточных волосков (3-9 клеток). Клетки трихом имеют спавшиеся стенки через одну клетку (рис. 8-2). На нижней стороне листа визуализируются мелкие железки. Более интенсивное опушение наблюдается для молодых листьев. Цвет листовой пластинки зеленый, по краю с верхней стороны с фиолетовым оттенком (рис. 8-3). Черешок короткий, сильно опушен простыми волосками (рис. 8-4). Люминесценция тканей верхней стороны листа желтоватая, по краю листовой пластины – красная (рис. 8-5). Трихомы имеют желтоватое свечение (рис. 8-6). Снизу листа наблюдается желтоватое свечение трихом и жилок (рис. 8-8). При увеличении $\times 100$ можно отметить также ярко – желтую люминесценцию устьичного аппарата (рис. 8-7).

**Рисунок 8** – Черноголовка крупноцветковая: стереомикроскопия.

Обозначения: 1,2 – фрагменты верхней стороны листа ($\times 40$); 3,4 – нижней стороны листа ($\times 40$); 5,6 – люминесценция верхней стороны листа ($\times 100$); 7,8 – нижней стороны листа ($\times 40$).

Листовая пластинка черноголовки разрезной с верхней стороны также покрыта многочисленными трихомами (рис. 9-1), более длинными, чем у других видов (рис. 9-2). Край листа загнут на нижнюю сторону, по краю располагаются удлиненные и многочисленные простые волоски (рис. 9-3). Жилки сильно вдавлены и выступают снизу листа, желтого цвета, где расположено большое количество простых многоклеточных волосков (3-7 клеток), клетки иногда спавшиеся. Более интенсивное опушение наблюдается для молодых листьев. Цвет листовой пластинки зеленый, по краю с верхней стороны с фиолетовым оттенком. Черешок короткий, сильно опушен простыми многоклеточными волосками (рис. 9-4). Люминесценция тканей обеих сторон листа не выражена, трихомы и жилки имеют желтовато-зеленое свечение (рис. 9-5,6,7).

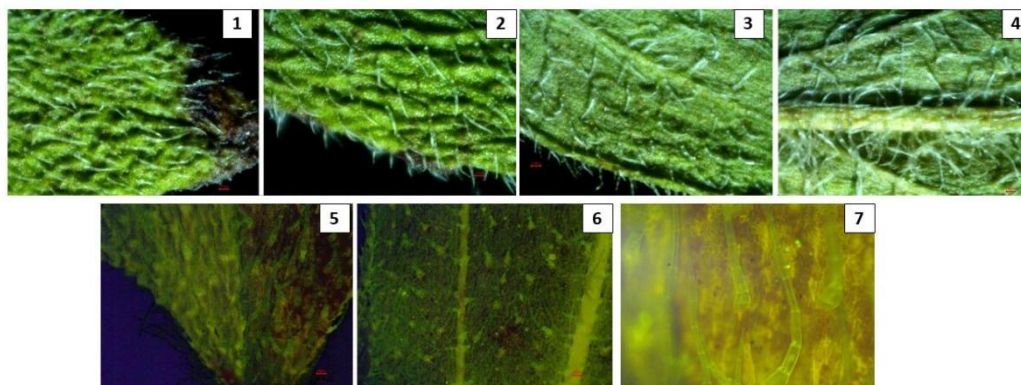


Рисунок 9 – Черноголовка разрезная: стереомикроскопия.

Обозначения: 1,2 – фрагменты верхней стороны листа (x40); 3,4 – нижней стороны листа (x40); 5,6 – люминесценция верхней стороны листа (x40); 7 – нижней стороны листа (x100).

Таблица 2 – Сравнительная характеристика морфологических признаков видов *Prunella* L.

| Объект | <i>Prunella grandiflora</i> L. | <i>Prunella vulgaris</i> L. | <i>Prunella laciniata</i> L. |
|---------------------------------------|--|-----------------------------|------------------------------|
| Кутикула | - | - | - |
| Сеть жилок | - | - | - |
| Млечники | - | - | - |
| Железистые волоски | +↓ | - | - |
| Простые волоски по краю | + | + | + |
| Простые волоски на черешке | + | + | + |
| Железистые волоски по краю | - | - | - |
| Простые волоски на поверхности | +↓↑ | +↓↑ | +↓↑ |
| Люминесценция листовой пластинки | Желтовато-зеленая, красноватая по краю | Слабая, трихомы - желтая | Слабая, трихомы - желтая |
| Люминесценция черешка | Желтоватая | Желтоватая | Желтоватая |
| Люминесценция выделительного аппарата | Желтоватая | - | - |

*↓ - нижняя сторона листа, ↑ – верхняя сторона листа, + – признак ярко выражен, - – признак не выражен, +/- – признак слабо выражен.

Для всех исследуемых образцов были также выявлен и определены диагностические микроскопические признаки.

При рассмотрении фрагмента листа толокнянки кавказской с поверхности верхнего эпидермиса видны многоугольные клетки эпидермиса, игольчатые кристаллы, объединенные группами (рис. 10-1). По краю листа толокнянки кавказской видны длинные двуклеточные простые волоски (рис. 10-6). Устьица преимущественно на нижней стороне листа, аномоцитного типа, побочные клетки которых с многочисленными включениями (рис. 10-4). Также снизу листа

по жилкам отмечено наличие опушения длинными простыми двуклеточными волосками (рис. 10-3), вдоль проводящих пучков визуализируется кристаллоносная обкладка (рис. 10-2,5).

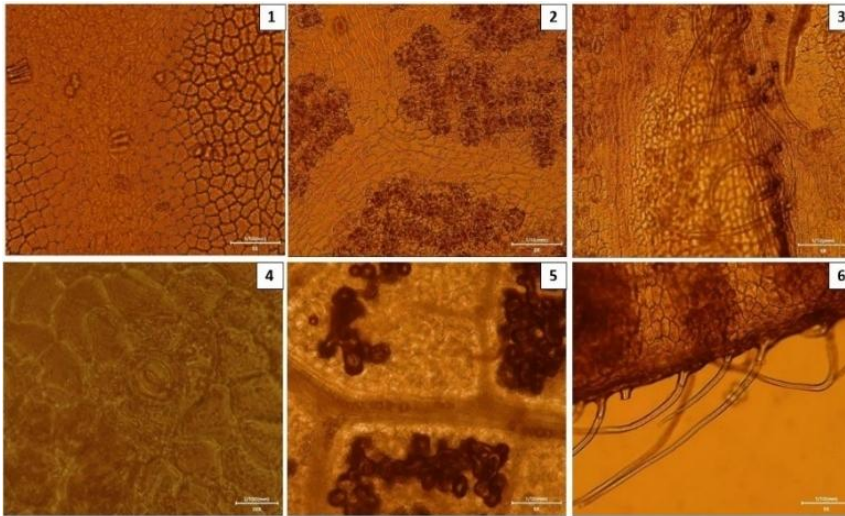


Рисунок 10 – Микрофотографии толокнянки кавказской.

Обозначения: 1 – фрагмент верхней стороны листа (x100); 2-5 – фрагмент нижней стороны листа; 6 – край листа (x200).

В результате оценки анатомических особенностей видов рода *Vaccinium* L. впервые выявлены следующие диагностические признаки:

Для брусники – наличие тяжа склеремхимных волокон по краю листовой пластинки (рис. 11-2) клеток прямостенного эпидермиса (рис. 10-1,3), губчатой паренхимы с крупными воздухоносными полостями (рис. 11-4) и паренхимы с крупными межклетниками, запасящими воздух (рис. 11-5,6).

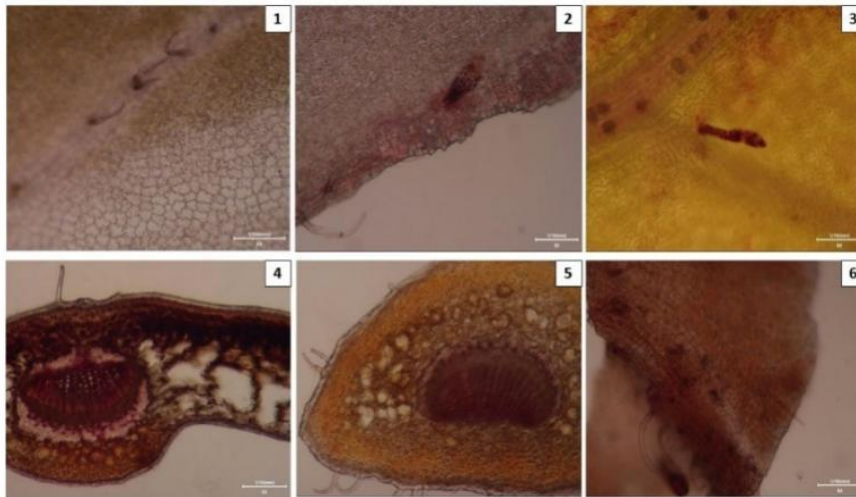


Рисунок 11 – Микрофотографии брусники обыкновенной.

Обозначения: 1,2 – фрагменты верхней стороны листа (x100); 3 – фрагмент нижней стороны листа (x200); 4 – фрагмент поперечного среза листа (x100); 5 – поперечный срез черешка (x100); 6 – препарат с поверхности черешка листа (x100).

Для черники обыкновенной – наличие булавовидных железок вдоль центральной жилки (рис. 12-1) и единично на поверхности листа (рис. 12-2), а также проводящих пучков с контрастной окраской, которые подходят к каждой булавовидной железке (рис. 12-4), отчетливо видна жилка с кристаллоносной обкладкой (рис. 12-3);

Для черники кавказской – наличие вдоль края листовой пластинки длинных, тонкостенных, бородавчатых волосков с красноватым содержимым (рис. 12-5,7), крупные друзы оксалата кальция (рис. 12-6), обильное опушение из коротких одноклеточных загнутых на верхушке волосков (рис. 12-8).

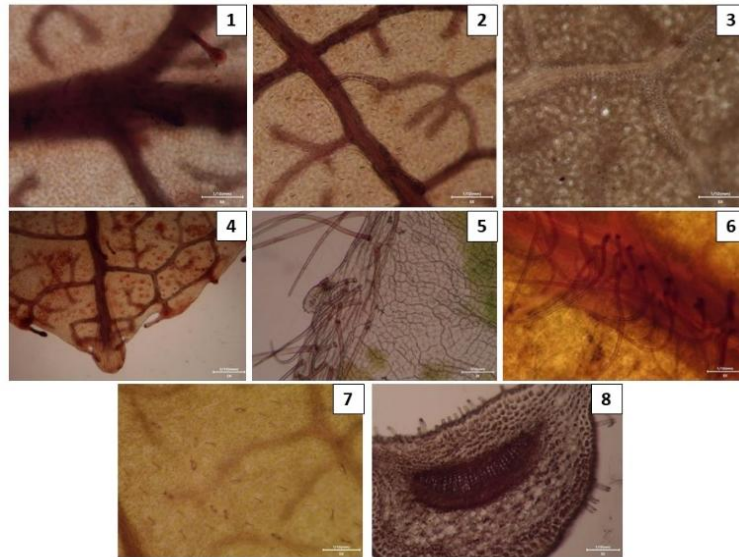


Рисунок 12 – Микрофотографии черники обыкновенной и черники кавказской.

Обозначения: 1 (x200) - фрагмент верхней стороны листа черники обыкновенной; 2,3 – фрагменты нижней стороны листа черники обыкновенной (x200; x400); 4 – фрагмент в области вершины листа черники обыкновенной (x100); 5,6 – фрагменты верхней стороны листа черники кавказской (x200); 7 – фрагмент нижней стороны листа черники кавказской (x400); 8 – фрагмент поперечного среза черешка черники кавказской (x100).

Для голубики обыкновенной – наличие единичных эфирно-масличных железок, одноклеточных волосков, устьиц с широко раскрытой устьичной щелью (рис. 13-1,2), многоклеточные сосочки, выступающие на нижней поверхности листа (рис. 12-3,4).

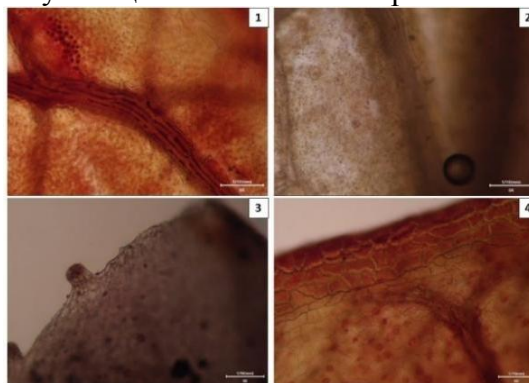


Рисунок 13 – Микрофотографии голубики обыкновенной.

Обозначения: 1,2 – фрагменты верхней стороны листа (x200); 3,4 – фрагмент нижней стороны листа (x200).

Для клюквы болотной и видов рода *Prunella* L. новых диагностических признаков не выявлено. Подтвержденные анатомические признаки были обобщены для внесения их в проекты ФС.

2.2. Определение основных групп биологически активных веществ видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. методом тонкослойной хроматографии

Разработка новых и совершенствование существующих методик определения подлинности и оценки качества ЛРС, подразумевают определение доминирующего компонента или соединения, по которому проводится сквозная стандартизация сырья и лекарственных средств на его основе. Основываясь на литературных данных и на результатах собственных исследований, доминирующим компонентом в сумме фенологликозидов для сырья видов толокнянки является арбутин, в сумме флавоноидов – гиперозид, для брусники обыкновенной - арбутин, для черники обыкновенной, черники кавказской, голубики обыкновенной и клюквы

болотной – хлорогеновая кислота. Для видов черноголовки – розмариновая кислота. В связи, с чем объективно рассматривать данные соединения как основные для определения подлинности метод ТСХ.

В каждом отдельном исследовании были определены оптимальные условия хроматографирования, позволяющие провести разделение основных компонентов исследуемых объектов методом ТСХ. Для чего были использованы спиртовые извлечения из растительного сырья. Детектирующий реагент – пары водного аммиака и спиртовой раствор хлорида алюминия

Валидация методик испытания на подлинность согласно ГФ РФ XIV издания включала доказательство специфичности методики. Разработанные условия определения подлинности методом ТСХ позволяют установить присутствие основного по содержанию компонента, при этом на хроматограмме наблюдается соответствие зон адсорбции в извлечении из ЛРС и зоны адсорбции СО по значению фактора удерживания и окрашиванию при использовании выбранного детектирующего агента. Параметр «робастность» нами установлен по влиянию времени насыщения хроматографической камеры на воспроизводимость ТСХ-профиля и эффективность разделения мажорного компонента от сопутствующих соединений.

В результате анализа нами предложены следующие условия определения основной группы БАВ в толокнянке листьях и бруснике обыкновенной листьях: сорбент – силикагелевые пластинки марки «Sorbfil» с полимерной ПТСХ-П-В или алюминиевой ПТСХ-АФ-А подложками, элюент – этилацетат-муравьиная кислота-вода (88:6:6), проявители - раствор натрия фосфорномолибдата 10%, оптимальный объем пробы – 60 мкл спиртового раствора, оптимальный объем стандартного образца арбутина - 10 мкл, время насыщения камеры парами элюента – 30 мин, время выдерживания пластинки в сушильном шкафу после обработки спиртовым раствором натрия фосфорномолибдата 10% - 10 минут. Для проявления хроматографических зон адсорбции хроматограмму просматривают в видимом свете. На хроматограмме испытуемого извлечения наблюдались зоны адсорбции синего цвета на уровне зоны адсорбции СО арбутина ($R_f=0,50$) и 2 зоны адсорбции синего цвета выше и ниже зоны адсорбции арбутина, а также допустимо наличие других зон адсорбции.

По результатам испытаний для определения гиперозида в толокнянке обыкновенной и толокнянке кавказской листьев, из всех систем была выбрана одна с учетом лучшего проявления и разделения хроматографических зон – этилацетат-ацетон-толуол-муравьиная кислота (20:10:10:5:5). Эффективное разделение наблюдалось при использовании пластинки марки «Sorbfil» ПТСХ-П-А-УФ, проявители - пары аммиака и алюминия хлорида спиртовой раствор 2%, оптимальный объем пробы – 7,5 мкл спиртового раствора, оптимальный объем стандартного образца гиперозида - 5 мкл, время насыщения камеры парами элюента – 30 мин, время выдерживания пластинки в сушильном шкафу после обработки алюминия хлоридом спиртовым раствором 2% - 3 минуты. На хроматограмме испытуемого извлечения наблюдались зоны адсорбции желто-зеленого цвета на уровне зон адсорбции СО гиперозида ($R_f=0,50$) и по 2 зоны бурого цвета выше и ниже зон адсорбции гиперозида, а также допустимо наличие других зон адсорбции.

Для черники листьев (черника обыкновенная, черника кавказская), голубики обыкновенной листьев и клюквы болотной побегов ведущей группой БАС являются фенолокислоты, основной из которых по содержанию является хлорогеновая кислота. Для разделения хлорогеновой кислоты для каждого извлечения были опробованы 10 различных систем растворителей. В результате анализа нами предложены следующие условия определения основной группы БАВ (табл. 3):

В чернике листьях: сорбент – силикагелевые пластинки марки «Sorbfil» с полимерной ПТСХ-П-В-УФ или алюминиевой ПТСХ-АФ-А-УФ подложками, элюент – Безводная муравьиная кислота-ледяная уксусная кислота-вода-этилацетат (7:7:14:72), проявители – спиртовой раствор алюминия хлорида 2%, оптимальный объем пробы – 2,5 мкл спиртового раствора, оптимальный объем стандартного образца хлорогеновой кислоты - 5 мкл, время насыщения камеры парами элюента – 30 мин, время выдерживания пластинки в сушильном шкафу после обработки спиртовым раствором алюминия хлорида 2% - 3 минуты. Для проявления хроматографических зон адсорбции хроматограмму просматривают в УФ свете при 254 нм. На хроматограмме

испытуемого извлечения наблюдались зона адсорбции голубого свечения на уровне зоны адсорбции СО хлорогеновой кислоты ($R_f=0,50$) и 3 зоны адсорбции желтого цвета выше и светло-синего цвета ниже зоны адсорбции хлорогеновой кислоты, а также допустимо наличие других зон адсорбции.

В голубике болотной листьях: сорбент – силикагелевые пластинки марки «Sorbfil» с полимерной ПТСХ-П-В-УФ или алюминиевой ПТСХ-АФ-А-УФ подложками, элюент – Безводная муравьиная кислота-ледяная уксусная кислота-вода-этилацетат (7,5:7,5:18:67), проявители – спиртовой раствор алюминия хлорида 2%, оптимальный объем пробы – 7,5 мкл спиртового раствора, оптимальный объем стандартного образца хлорогеновой кислоты - 5 мкл, время насыщения камеры парами элюента – 30 мин, время выдерживания пластинки в сушильном шкафу после обработки спиртовым раствором алюминия хлорида 2% - 3 минуты. Для проявления хроматографических зон адсорбции хроматограмму просматривают в УФ свете при 254 нм. На хроматограмме испытуемого извлечения наблюдались зона адсорбции голубого свечения на уровне зоны адсорбции СО хлорогеновой кислоты ($R_f=0,78$) и 1 зоны адсорбции желтого цвета выше и светло-синего цвета ниже зоны адсорбции хлорогеновой кислоты, а также допустимо наличие других зон адсорбции.

В клюкве болотной побегах: сорбент – силикагелевые пластинки марки «Sorbfil» с полимерной ПТСХ-П-В-УФ или алюминиевой ПТСХ-АФ-А-УФ подложками, элюент – Безводная муравьиная кислота-вода-этилацетат (10:10:84), проявители – спиртовой раствор алюминия хлорида 2%, оптимальный объем пробы – 7,5 мкл спиртового раствора, оптимальный объем стандартного образца хлорогеновой кислоты - 5 мкл, время насыщения камеры парами элюента – 30 мин, время выдерживания пластинки в сушильном шкафу после обработки спиртовым раствором алюминия хлорида 2% - 3 минуты. Для проявления хроматографических зон адсорбции хроматограмму просматривают в УФ свете при 254 нм. На хроматограмме испытуемого извлечения наблюдались зона адсорбции голубого свечения на уровне зоны адсорбции СО хлорогеновой кислоты ($R_f=0,53$) и 5 зон адсорбции (2-х желтого, 2-х бурого и 1 голубого цвета) выше и бурого цвета ниже зоны адсорбции хлорогеновой кислоты, а также допустимо наличие других зон адсорбции.

Для черноголовки травы (черноголовка обыкновенная, черноголовка крупноцветковая и черноголовка разрезная) ведущей группой БАС являются фенолокислоты, основной из которых по содержанию является розмариновая кислота. В связи, с чем объективно рассматривать данное соединение как основное для определения подлинности черноголовки травы методом ТСХ. Полученные извлечения в объеме 2,5, 5,0 и 7,5 и 10 мкл наносили на хроматографические пластинки марки Sorbfil (Россия) ПТСХ-П-В-УФ и ПТСХ-АФ-А-УФ размером 100x100 мм. Зоны адсорбции просматривали в видимом и УФ-свете (при обработке парами аммиака и алюминия хлоридом спиртовым раствором 2%). Использовали стандартный образец розмариновой кислоты. Зоны адсорбции проявляли различными проявителями, оценивая контрастность, специфичность и доступность детектирующего реактива.

В результате анализа нами предложены следующие условия определения основной группы БАВв черноголовке траве: сорбент – силикагелевые пластинки марки «Sorbfil» с полимерной ПТСХ-П-В-УФ или алюминиевой ПТСХ-АФ-А-УФ подложками, элюент – безводная муравьиная кислота-ацетон-метилхлорид (8,5:25:85), проявители – спиртовой раствор алюминия хлорида 2%, оптимальный объем пробы – 7,5 мкл спиртового раствора, оптимальный объем стандартного образца розмариновой кислоты - 7,5 мкл, время насыщения камеры парами элюента – 30 мин, время выдерживания пластинки в сушильном шкафу после обработки спиртовым раствором алюминия хлорида 2% - 3 минуты. Для проявления хроматографических зон адсорбции хроматограмму просматривают в УФ свете при 254 нм (табл. 4).

На хроматограммах испытуемых извлечений наблюдались зоны адсорбции голубого свечения на уровне зоны адсорбции СО розмариновой кислоты ($R_f=0,69$) и 2 зоны адсорбции (желтого и красного цвета) выше и 2 желтого и светло-синего цвета ниже зоны адсорбции розмариновой кислоты, а также допустимо наличие других зон адсорбции.

Таблица 3 – Хроматографические параметры хлорогеновой кислоты в различных элюирующих системах для сырья видов *рода Vaccinium L.*

| № п/п | Элюент | $R_f \pm 0,02$, стандартный образец | $R_f \pm 0,02$, исследуемое извлечение | | | |
|----------|--|--|---|---------------------------------|------------------------------------|------------------------------|
| | | | Черники обыкновенной листья | Черники кавказской листья | Голубики обыкновенной листья | Клюквы болотной побеги |
| 1 | Безводная муравьиная кислота-вода-этилацетат (10:10:84) | 0,51 | 0,52 | 0,51 | 0,49 | 0,53* |
| 2 | Безводная муравьиная кислота-вода-этилацетат (8:8:84) | 0,47 | 0,47 | 0,46 | 0,48 | 0,49 |
| 3 | Безводная муравьиная кислота-ледяная уксусная кислота-вода-этилацетат (11:11:27:100) | 0,64 | 0,65 | 0,64 | 0,66 | 0,66 |
| 4 | Безводная муравьиная кислота-ледяная уксусная кислота-вода-этилацетат (7:7:14:72) | 0,48 | 0,49 | 0,50 | 0,49 | 0,50 |
| 5 | Безводная муравьиная кислота-ледяная уксусная кислота-вода-этилацетат (7,5:7,5:18:67) | 0,79 | 0,77 | 0,78 | 0,78* | 0,81 |
| 6 | Безводная муравьиная кислота-ледяная уксусная кислота-вода-этилацетат (7:7:14:72) | 0,52 | 0,52* | 0,53* | 0,51 | 0,54 |
| 7 | Вода-метанол-этилацетат (8:15:77) | 0,17 | 0,21 | 0,20 | 0,19 | 0,19 |
| 8 | Безводная муравьиная кислота - ледяная уксусная кислота вода-этилацетат (11:11:26:100) | 0,63 | 0,65 | 0,64 | 0,65 | 0,65 |
| 9 | Безводная муравьиная кислота-метанол-вода-этилацетат (2,5:4:4:50) | 0,51 | 0,49 | 0,50 | 0,51 | 0,53 |
| 10 | Вода-ацетонитрил-ледяная уксусная кислота (78:19:31) | Нет разделения | Нет разделения | Нет разделения | Нет разделения | Нет разделения |

*- значение R_f в системе растворителей с наилучшим разделением основного вещества.

Таблица 4 – Хроматографические параметры розмариновой кислоты в различных элюирующих системах для сырья рода *Prunella* L.

| № п/п | Элюент | $R_f \pm 0,02$, стандартный образец | $R_f \pm 0,02$, исследуемое извлечение | | |
|----------|--|--|---|---|---------------------------------|
| | | | Черноголовки обыкновенной травы | Черноголовки крупноветковой травы | Черноголовки разрезной травы |
| 1 | Безводная муравьиная кислота-ацетон-толуол (1:6:11) | 0,53 | 0,55 | 0,54 | 0,53 |
| 2 | Безводная муравьиная кислота-вода-этилацетат (6:6:90) | 0,87 | 0,88 | 0,89 | 0,88 |
| 3 | Бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (4:1:2) | 0,89 | 0,90 | 0,91 | 0,89 |
| 4 | Толуол-этилацетат-безводная муравьиная кислота (3:7:0,1) | 0,46 | 0,46 | 0,45 | 0,47 |
| 5 | Этилацетат-ледяная уксусная кислота-вода (40:5:5) | 0,93 | 0,96 | 0,95 | 0,95 |
| 6 | Безводная муравьиная кислота-ацетон-метилхлорид (8,5:25:85) | 0,69 | 0,68* | 0,70* | 0,69* |
| 7 | Хлороформ-этилацетат-уксусная кислота 5% (20:20:5) | Нет разделения | Нет разделения | Нет разделения | Нет разделения |
| 8 | Толуол-хлороформ-ацетон-безводная муравьиная кислота (5:4:1:0,2) | Нет разделения | Нет разделения | Нет разделения | Нет разделения |
| 9 | Этилацетат-вода-безводная муравьиная кислота-ледяная уксусная кислота (100:26:11:11) | 0,95 | 0,95 | 0,93 | 0,94 |
| 10 | Толуол-этилацетат-безводная муравьиная кислота (7:2:1) | Нет разделения | Нет разделения | Нет разделения | Нет разделения |
| 11 | Бутанол-ледяная уксусная кислота-вода (60:15:25) | 0,78 | 0,81 | 0,80 | 0,79 |

*- значение R_f в системе растворителей с наилучшим разделением основного вещества.

2.3. ДНК-штрихкодирование некоторых видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. молекулярно-генетическим методом

При ДНК-штрихкодирование растений рода *Arctostaphylos* Adans., было выявлено что, длина участков ITS1 для видов вересковых составила 710 нуклеотидных позиций. Среди последовательностей для всех видов вересковых обнаружено 267 полиморфных позиций, среди которых в 99 позициях происходила только одна замена. Внутри рода *Arctostaphylos* Adans., последовательности ITS1 маловариабельны. Исследуемые виды можно идентифицировать по заменам 145 (G/C) – *Arctostaphylos caucasica* Lipsch., и 509 (A/G) – *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. На основании полученных данных, а также данных о последовательностях интрона ITS1 из GenBank толокнянка кавказская вероятнее является не самостоятельным видом, а подвидом толокнянки обыкновенной.

Внутри рода *Vaccinium* L., по заменам в трех позициях: 168, 215, 322 объединяются представители вида *Vaccinium vitis-idaea* L., которые могут быть использованы для идентификации сырья брусники обыкновенной. Следует отметить, что для вида *Vaccinium uliginosum* L. специфичные замены не обнаружены. Позиция 250 характеризуется заменой аденина на тимин, а позиция 567 – заменой аденина на гуанин, которые встречаются только у представителей видов *Vaccinium myrtillus* L. и *Vaccinium arctostaphylos* L. соответственно, что позволяет считать эти позиции специфичными для ЛРС «Черники листьев». Наиболее достоверно определить подлинность возможно для *Vaccinium oxycoccos* L., для побегов клюквы установлено 9 специфичных нуклеотидных замен.

При ДНК-штрихкодировании растений рода *Prunella* L., было выявлено, что длина участков ITS1 для видов черноголовок составила 619 нуклеотидных позиций. Среди последовательностей для всех видов черноголовок обнаружено 11 полиморфных позиций, среди которых в 8 позициях происходила только одна замена. Среди видов рода *Prunella* L. наиболее точно возможно установить подлинность по количеству специфичных нуклеотидных замен для *P. laciniata*, которую можно идентифицировать по 5 позициям нуклеотидных замен. *P. vulgaris* отличается по трем позициям нуклеотидных замен, а нуклеотидная последовательность *P. grandiflora* не имеет специфичных позиций.

3. Фенольные соединения видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L.

Важнейшим этапом исследования растительных объектов для последующего внедрения их сырья в медицинскую практику является детальный химический анализ основных групп биологически активных веществ (БАВ). Корректно расшифрованный уникальный состав и количественное содержание впоследствии будут определять выбор методов стандартизации, а также виды фармакологической активности. С использованием метода ВЭЖХ-ФДМД-ИЭР-МС были анализированы спиртовые извлечения (спирт этиловый 70%) из каждого вида сырья.

3.1. Фенольные соединения видов рода *Arctostaphylos* Adans.

В листьях и стеблях *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng. идентифицировано 34 соединения фенольной природы, впервые обнаружены 8 (4,6-ди-О-галлоил глюкоза; 2,3-ди-О-галлоил глюкоза; 6-О-галлоил арбутин; 1,4,6-три-О-галлоил глюкоза; 1,2,4,6-тетра-О-галлоил глюкоза; тетра-О-галлоил гексоза; тетра-О-галлоил гексоза. Для *Arctostaphylos caucasica* Lipsch. все 37 соединений были идентифицированы впервые, так как этот вид ранее не исследовался. Основными компонентами фенольных соединений двух видов являются: арбутин; 4,6-ди-О-галлоил глюкоза; 2,3-ди-О-галлоил глюкоза; 1,6-Ди-О-галлоил глюкоза; 6-О-галлоил арбутин; 1,4,6-три-О-галлоил глюкоза; 1,2,4,6-тетра-О-галлоил глюкоза; тетра-О-галлоил гексоза; тетра-О-галлоил гексоза; кверцетин-3-О-галактозид; 1,2,3,4,6-пента-О-галлоил глюкоза. Количественный состав компонентов представлен в таблице 5.

Таблица 5 – Количественное содержание основных по содержанию соединений видов рода *Arctostaphylos* Adans. (мг/г от массы воздушно-сухого сырья)

| № п/п | Соединение | <i>Arctostaphylos uva-ursi</i> (L.) Spreng. | | <i>Arctostaphylos caucasica</i> Lipsch. | |
|-------|--|---|--------|---|--------|
| | | Листья | Стебли | Листья | Стебли |
| 1 | Арбутин | 7,37 | 1,79 | 7,49 | 1,14 |
| 2 | 4,6-ди- <i>O</i> -галлоил глюкоза | 2,38 | 1,16 | 2,04 | 3,00 |
| 3 | 2,3-ди- <i>O</i> -галлоил глюкоза | 1,07 | <0,01 | 4,88 | 7,81 |
| 4 | 1,6-ди- <i>O</i> -галлоил глюкоза | 0,75 | 2,17 | 0,28 | 3,74 |
| 5 | 6- <i>O</i> -Галлоил арбутин | 4,44 | <0,01 | 4,82 | 0,64 |
| 6 | 1,4,6-три- <i>O</i> -галлоил глюкоза | 35,78 | 2,95 | 18,54 | 6,75 |
| 7 | 1,2,4,6-тетра- <i>O</i> -галлоил глюкоза | 6,82 | <0,01 | 85,09 | 19,52 |
| 8 | тетра- <i>O</i> -галлоил гексоза | 34,09 | 2,99 | 10,61 | 1,97 |
| 9 | тетра- <i>O</i> -галлоил гексоза | 26,77 | 2,63 | 3,86 | 1,80 |
| 10 | Кверцетин-3- <i>O</i> -галактозид | 20,96 | 3,71 | 6,17 | 1,75 |
| 11 | 1,2,3,4,6-пента- <i>O</i> -галлоил глюкоза | 23,18 | 1,38 | 59,62 | 3,38 |

Нами было выявлено, что содержание основных действующих веществ было выше в листьях, чем в стеблях. На основании полученных данных дальнейшие исследования проводили с листьями видов толокнянки.

3.2. Фенольные соединения видов рода *Vaccinium* L.

В листьях брусники было идентифицировано 29 соединений фенольной природы: арбутин, *O*-кофеил арбутин (и 2 его изомера), протокатеховая кислота, катехин/эпикатехин димер, 4-*O*-кофеилхинная кислота, 1,3-ди-*O*-кофеилхинная кислота, 4,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота, процианидин А1, процианидин В1, процианидин В2, процианидин С1, кверцетин-3-*O*-рутинозид, кверцетин-3-*O*-галактозид, кверцетин-3-*O*-глюкозид, кверцетин *O*-(3-гидрокси-3-метилглутарил)-*O*-дезоксигексозил-*O*-гексозид, кверцетин-3-*O*-ксилозид, кверцетин-3-*O*-арабинопиранозид, кверцетин-3-*O*-арабинофуранозид, кверцетин-3-*O*-рамнозид, кверцетин-3-*O*-(6''-ацетил)-глюкозид, кверцетин *O*-дезоксигексозид, кемпферол-3-*O*-рамнозид, кверцетин *O*-(3-гидрокси-3-метилглутарил)-дезоксигексозид, кверцетин-3-*O*-{4''-(3-гидрокси-3-метилглутарил)}-рамнозид, кемпферол-3-*O*-{4''-(3-гидрокси-3-метилглутарил)}-рамнозид.

Исходя из данных таблицы 9, основными компонентами по содержанию листьев брусники являются феноглюкозид арбутин и его конъюгат 2-*O*-кофеил арбутин, 5-*O*-кофеилхинная кислота, 4,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота, а также флавоноиды монозиды кверцетина - кверцетин-3-*O*-галактозид, кверцетин-3-*O*-арабинопиранозид, кверцетин-3-*O*-{4''-(3-гидрокси-3-метилглутарил)}-рамнозид.

В чернике обыкновенной листьях было идентифицировано 9 соединений фенольной природы: 4-*O*-кофеилхинная кислота, 5-*O*-кофеилхинная кислота, 4,5-ди-*O*-кофеилхинная кислота, кофейная кислота, кверцетин-3-*O*-галактозид, кверцетин-3-*O*-глюкозид, кверцетин-3-*O*-арабинопиранозид, кверцетин-3-*O*-арабинофуранозид и кверцетин-3-*O*-рамнозид. В черники кавказской листьях было идентифицировано 10 соединений фенольной природы: 4-*O*-кофеилхинная кислота, 5-*O*-кофеилхинная кислота, кофейная кислота, кверцетин-3-*O*-рутинозид, кверцетин-3-*O*-галактозид, кверцетин-3-*O*-глюкозид, кверцетин-3-*O*-арабинопиранозид, кверцетин-3-*O*-арабинофуранозид и кверцетин-3-*O*-рамнозид и кверцетин-3-*O*-(6''-ацетил)-глюкозид. В клюкве болотной побегах было идентифицировано 11 соединений фенольной природы: 4-*O*-кофеилхинная кислота, 5-*O*-кофеилхинная кислота, кверцетин ди-*O*-дезоксигексозил-*O*-гексозид, кверцетин-3-*O*-рутинозид, кверцетин-3-*O*-галактозид, кверцетин-3-*O*-глюкозид, кверцетин-3-*O*-ксилозид, кверцетин-3-*O*-арабинопиранозид, кверцетин-3-*O*-арабинофуранозид и кверцетин-3-*O*-рамнозид (табл. 6).

Таблица 6 – Количественное содержание основных соединений видов рода *Vaccinium* L. (мг/г от массы воздушно-сухого сырья)

| № п/п | Соединение | <i>Vaccinium vitis-idaea</i> L. | <i>Vaccinium myrtillus</i> L. | <i>Vaccinium arctostaphylos</i> L. | <i>Vaccinium uliginosum</i> L. | <i>Vaccinium oxycoccus</i> L. |
|-------|--|---------------------------------|-------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 1 | Арбутин | 63,33 ± 1,29 | - | - | - | - |
| 2 | 5- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота | 8,49 ± 0,14 | 226,85 ± 5,21 | 105,32 ± 2,41 | 166,98 ± 3,65 | 36,61 ± 0,81 |
| 3 | 4- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота | - | < 0,01 | 8,01 ± 0,14 | < 0,01 | 9,46 ± 0,015 |
| 4 | Кофейная кислота | - | < 0,01 | 4,29 ± 0,08 | - | - |
| 5 | 2- <i>O</i> -Кофеил арбутин | 9,90 ± 0,23 | - | - | - | - |
| 6 | Кверцетин-3- <i>O</i> -галактозид (гиперозид) | 2,51 ± 0,05 | 4,69 ± 0,09 | 3,99 ± 0,06 | 2,7 ± 0,03 | 3,85 ± 0,07 |
| 7 | Кверцетин-3- <i>O</i> -арабинопиранозид (гвайаверин) | 1,11 ± 0,02 | 1,34 ± 0,02 | 1,29 ± 0,02 | 0,45 ± 0,01 | 0,85 ± 0,02 |
| 8 | Кверцетин-3- <i>O</i> -арабинофуранозид (авикулярин) | 2,77 ± 0,04 | < 0,01 | 0,99 ± 0,02 | - | 1,81 ± 0,03 |
| 9 | Кверцетин-3- <i>O</i> -рамнозид (кверцитрин) | 3,31 ± 0,07 | 2,77 ± 0,05 | 1,23 ± 0,02 | - | 1,71 ± 0,03 |
| 10 | 4,5-ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота | 4,87 ± 0,09 | < 0,01 | - | - | - |
| 11 | Кверцетин-3- <i>O</i> -{4''-(3-гидрокси-3-метилглутарил)}-рамнозид | 3,75 ± 0,08 | - | - | - | - |
| 12 | Кверцетин-3- <i>O</i> -глюкозид (изокверцитрин) | - | 12,02 | 2,38 ± 0,05 | 13,17 ± 0,25 | < 0,01 |
| 13 | Кверцетин-3- <i>O</i> -рутинозид (рутин) | - | - | 1,46 ± 0,03 | - | 4,33 ± 0,09 |
| 14 | Кверцетин-3- <i>O</i> -(6''-ацетил)-глюкозид | - | - | 0,70 ± 0,01 | - | - |
| 15 | Кемпферол-3- <i>O</i> -глюкозид (астрагалин) | - | - | - | 6,38 ± 0,12 | - |
| 16 | Кверцетин-3- <i>O</i> -ксилозид (рейноутрин) | - | - | - | - | < 0,01 |
| 17 | Кверцетин ди- <i>O</i> -дезоксигексозил- <i>O</i> -гексозид | - | - | - | - | 3,25 ± 0,07 |

3.3. Фенольные соединения видов рода *Prunella* L.

В траве видов рода *Prunella* L. метода ВЭЖХ-ФДМД-ИЭР-МС было идентифицировано 16 соединений фенольной природы (табл. 7).

Таблица 7 – Количественное содержание соединений видов рода *Prunella* L. (мг/г от массы воздушно-сухого сырья)

| № п/п | Соединение | <i>Prunella grandiflora</i> L. | <i>Prunella vulgaris</i> L. | <i>Prunella laciniata</i> L. |
|-------|---|--------------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| 1 | 2- <i>O</i> -Кофеил-треоновая кислота | 0,82 ± 0,02 | 0,56 ± 0,02 | следы |
| 2 | 3- <i>O</i> -Кофеил-треоновая кислота | 1,91 ± 0,04 | 1,85 ± 0,03 | 0,60 ± 0,01 |
| 3 | 5- <i>O</i> -Кофеил-хинную кислоту | 0,26 ± 0,00 | - | 3,62 ± 0,07 |
| 4 | Кофейная кислота | 0,11 ± 0,00 | 0,26 ± 0,00 | 0,33 ± 0,00 |
| 5 | Кверцетин-3- <i>O</i> -(4''-ксилозил-6''-рамнозил)-гликозид | 2,20 ± 0,05 | следы | - |
| 6 | Кверцетин-3- <i>O</i> -(6''-рамнозил)-гликозид | 10,74 ± 0,21 | 5,12 ± 0,10 | - |
| 7 | Розмариновая кислота-3'- <i>O</i> -гликозид | 6,39 ± 0,12 | 2,07 ± 0,04 | следы |
| 8 | Кверцетин-3- <i>O</i> -(6''-{3-гидрокси-3-метилглутароил})-гликозид | 9,55 ± 0,19 | 3,17 ± 0,07 | 3,62 ± 0,08 |
| 9 | Литоспермовая кислота | следы | следы | - |
| 10 | Кемпферол-3- <i>O</i> -гликозид | следы | следы | следы |
| 11 | Розмариновая кислота | 51,87 ± 1,04 | 42,62 ± 0,84 | 32,05 ± 0,61 |
| 12 | Сальвианоловая кислота А | следы | - | - |
| 13 | Сальвианоловая кислота В | следы | - | - |
| 14 | Кверцетин | следы | следы | - |
| 15 | Кемпферол | следы | - | следы |
| 16 | Кверцетин-7- <i>O</i> -дезоксигексозил-гексозид | - | - | 3,05 ± 0,05 |

Исходя из результатов таблицы 8, видно, что основным компонентом травы рода *Prunella* L. является фенолокислота – розмариновая кислота, а флавоноиды представлены биозидами кверцетина, мажорными из которых являлись кверцетин-3-*O*-(6''-рамнозил)-гликозид и кверцетин-3-*O*-(6''-{3-гидрокси-3-метилглутароил})-гликозид.

3.4. Выделение веществ фенольной природы из брусники обыкновенной листьев

После предварительного хроматографического анализа нами было выделено из листьев брусники 24 соединения. Схема выделения представлена на рисунке 14.

Из элюата А при концентрировании выпадал осадок арбутина (56 г, 4). Элюат В (85 г) хроматографировали на SiO₂ (КХ, 7×40 см, EtOAc–Me₂CO 100:0→50:50), ОФ-SiO₂ (1×20 см, H₂O–MeCN 95:5→20:80) и Сефадексе LH-20 (3×70 см, MeOH–H₂O 80:20→30:70), что привело к выделению 11 соединений, идентифицированных как рутин (кверцетин-3-*O*-рутинозид, 14 мг, 5), гиперозид (кверцетин-3-*O*-галактозид, 1.6 г, 6), изокверцитрин (кверцетин-3-*O*-гликозид, 35 мг, 7), рейноутрин (кверцетин-3-*O*-ксилозид, 27 мг, 8), гвайаверин (кверцетин-3-*O*-арабинопиранозид, 630 мг, 9), авикулярин (кверцетин-3-*O*-арабинофуранозид, 820 мг, 10), кверцитрин (кверцетин-3-*O*-рамнозид, 2.1 г, 11), никотифлорин (кемпферол-3-*O*-рутинозид, 9 мг, 12), кемпферол-3-*O*-галактозид (11 мг, 13), астрагалин (кемпферол-3-*O*-гликозид, 10 мг, 14) и афцелин (кемпферол-3-*O*-рамнозид, 25 мг, 15). Элюат С (63 г) разделяли как описано выше, а также с помощью преп. ВЭЖХ (элюент А – MeCN, элюент В – H₂O; градиентный режим, % В: 0–45 мин, 10–12%, 45–90 мин, 12–22%, 90–140 мин 22–44%, 140–210 мин 44–63%), что позволило получить 1 (25 мг), 2 (58 мг), 3 (46 мг), 5-*O*-кофеилхинную кислоту (2 г, 16), 4,5-ди-*O*-кофеилхинную кислоту (1.4 г, 17), 2'-*O*-кофеил-арбутин (8.3 г, 18), 6'-*O*-кофеил-арбутин (21 мг, 19), кверцетин-3-*O*-{6''-*O*-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-гликозид (22 мг, 20), кверцетин-3-*O*-{6''-*O*-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-галактозид (29 мг, 21), кверцетин-3-*O*-{4''-*O*-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-рамнозид (1.7 г, 22), кверцетин-3-*O*-(6''-*O*-ацетил)-гликозид (14 мг, 23) и кемпферол-3-*O*-(6''-*O*-ацетил)-гликозид (3 мг, 24).

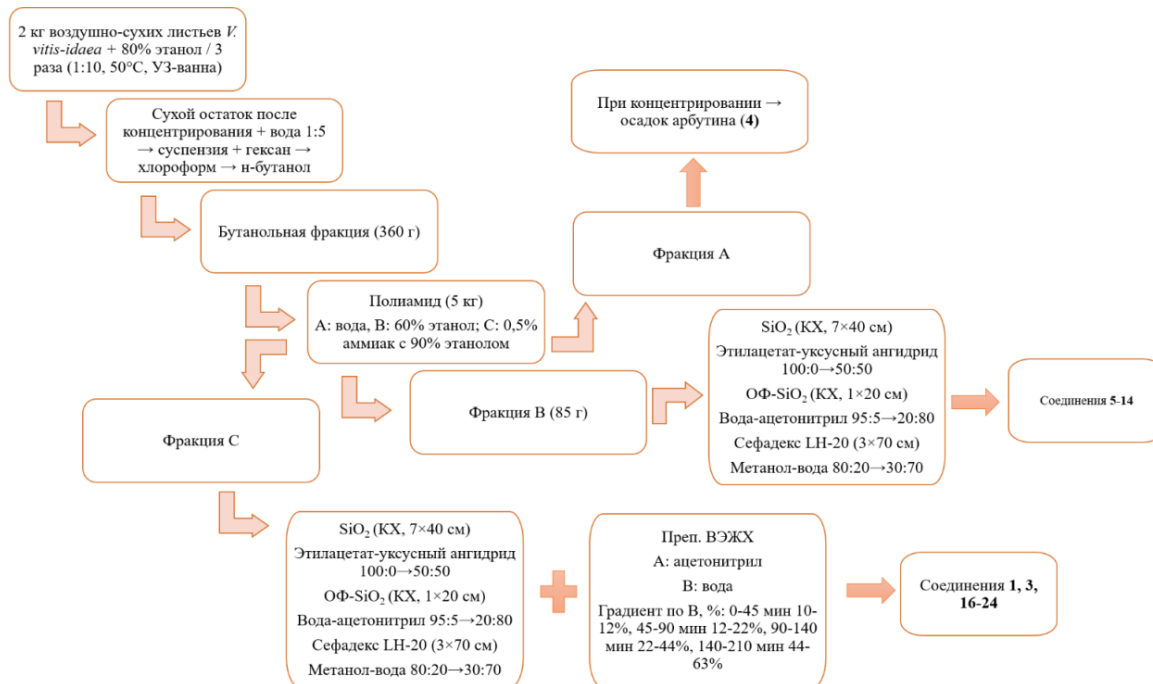
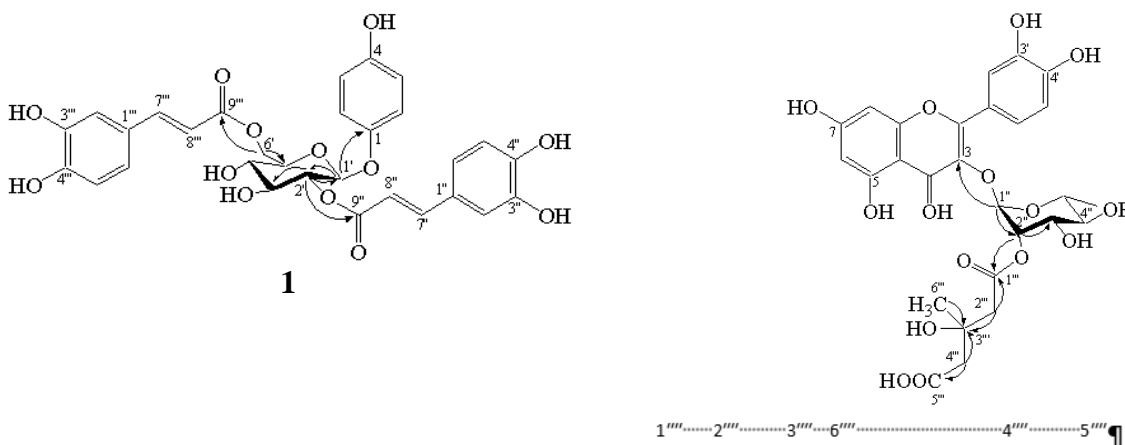


Рисунок 14 – Схема выделения фенольных соединений из листьев *Vaccinium vitis-idaea* L.

В результате хроматографического разделения этанольного извлечения из листьев *V. vitis-idaea* L. с применением КХ на полиамиде, силикагеле, Сефадексе LH-20 и препаративной ВЭЖХ было выделено 24 соединения, в том числе новое производное арбутина 1 и два новых гликозида кверцетина 2 и 3 (рисунок 15).



2: R = H; 3: R = COCH₂C(CH₃)(OH)CH₂COOH

Рисунок 15 – Новые соединения из листьев *Vaccinium vitis-idaea* L.

Водный слой хроматографировали на Сефадексе LH-20 (4×70 см, H₂O–MeOH 100:0→30:70). Фракции с Сефадекса LH-20, элюируемые 20% MeOH, разделяли на MCI gel CHP20P (3×50 см, 35% EtOH) и преп. ВЭЖХ (элюент А – MeCN, элюент В – H₂O; градиентный режим, % В: 0–90 мин 5–20%, 90–120 мин 20–25%), что позволило выделить 1 (18 мг), (+)-катехин (20.6 г, 4), (-)-эпикатехин (1.2 г, 5), (+)-галлокатехин (28 мг, 6), (-)-эпигаллокатехин (6 г, 7), (+)-галлокатехин галлат (5 мг, 8), (-)-эпигаллокатехин галлат (3 мг, 9), (+)-катехин-3-О-гликозид (7 мг, 10) и (+)-катехин-3-О-рамнозид (52 мг, 11). Фракции с Сефадекса LH-20, элюируемые 60% MeOH, рехроматографировали на Сефадексе LH-20 (2×70 см, 95% EtOH), MCI gel CHP20P (3×50 см, 45% EtOH) и преп. ВЭЖХ (элюент А – MeCN, элюент В – H₂O; градиентный режим, % В: 0–30 мин 5–35%, 30–45 мин 35–45%, 45–100 мин 45–70%, 100–150 мин 70–86%). В результате были получены 2 (42 мг), 3 (22 мг), процианидины В1 (7.7 г, 12), В2 (143 мг, 13), В3 (26.4 г, 14), В4 (25 мг, 15), (-)-эпикатехин-(4α→8)-(+)-катехин (6 мг, 16), процианидин В3-3-О-рамнозид (192 мг, 17).

Вакцинизид А (1). $C_{30}H_{28}O_{13}$. УФ-спектр (MeOH, λ_{max} , нм): 285 пл., 328. HR-ESI-MS, m/z : 619.4504 $[M+Na]^+$ (расч. 619.4832 для $C_{30}H_{28}O_{13}Na$). ESI-MS, m/z (%): 619 $[M+Na]^+$ (100), 597 $[M+H]^+$ (5), 435 $[(M+H)-C_9H_6O_3]^+$ (27), 273 $[(M+H)-2 \times C_9H_6O_3]^+$ (34). ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 1695, 1630, 1501. Спектр ЯМР 1H (500 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_H , м.д.). Спектр ЯМР ^{13}C (125 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_C , м.д.) (табл. 8).

Вакцинизид В (2). $C_{27}H_{28}O_{15}$. УФ-спектр (MeOH, λ_{max} , нм): 254, 349. HR-ESI-MS, m/z : 591.4004 $[M-H]^-$ (расч. 591.4548 для $C_{27}H_{27}O_{15}$). ESI-MS, m/z (%): 591 $[M-H]^-$. MS²: [591] 529 $[(M-H)-CH_2O_3]^-$ (16), 489 $[(M-H)-CH_2O_3-C_3H_4]^-$ (29), 447 $[(M-H)-CH_2O_3-C_3H_4-C_2H_2O]^-$ (83), 301 $[(M-H)-CH_2O_3-C_3H_4-C_2H_2O-C_6H_{10}O_4]^-$ (100). ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 1720, 1650. Спектр ЯМР 1H (500 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_H , м.д.). Спектр ЯМР ^{13}C (125 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_C , м.д.) (табл. 9).

Вакцинизид С (3). $C_{33}H_{36}O_{19}$. УФ-спектр (MeOH, λ_{max} , нм): 254, 348. HR-ESI-MS, m/z : 735.5622 $[M-H]^-$ (расч. 735.5708 для $C_{33}H_{35}O_{19}$). ESI-MS, m/z (%): 735 $[M-H]^-$. MS²: [735] 673 $[(M-H)-CH_2O_3]^-$, 633 $[(M-H)-CH_2O_3-C_3H_4]^-$ (2), 611 $[(M-H)-2 \times CH_2O_3]^-$ (9), 591 $[(M-H)-CH_2O_3-C_3H_4-C_2H_2O]^-$ (6), 571 $[(M-H)-2 \times CH_2O_3-C_3H_4]^-$ (18), 531 $[(M-H)-2 \times CH_2O_3-2 \times C_3H_4]^-$ (14), 529 $[(M-H)-2 \times CH_2O_3-C_3H_4-C_2H_2O]^-$ (4), 489 $[(M-H)-2 \times CH_2O_3-2 \times C_3H_4-C_2H_2O]^-$ (35), 447 $[(M-H)-2 \times CH_2O_3-2 \times C_3H_4-2 \times C_2H_2O]^-$ (79), 301 $[(M-H)-2 \times CH_2O_3-2 \times C_3H_4-2 \times C_2H_2O-C_6H_{10}O_4]^-$ (100). ИК-спектр (ν , cm^{-1}): 1721, 1715, 1648. Спектр ЯМР 1H (500 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_H , м.д.). Спектр ЯМР ^{13}C (125 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_C , м.д.) (табл. 9).

Таблица 8 – Спектры ЯМР 1H (500 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_H , м.д., J/Гц) и ^{13}C (125 Гц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_C , м.д.) соединения 1 и арбутина (*Брусники обыкновенной листья*)

| С-атом | δ_H | δ_C | Арбутин, δ_C |
|--------|--|--------------------|---------------------|
| 1 | - | 153.5 | 153.4 |
| 2, 6 | 6.90 (2H, д, J = 8.9) | 119.2 | 118.9 |
| 3, 5 | 6.67 (2H, д, J = 8.9) | 116.0 | 116.2 |
| 4 | - | 152.9 | 152.7 |
| 1' | 4.97 (1H, д, J = 7.5) | 102.3 | 103.5 |
| 2' | 5.11 (1H, дд, J = 7.5, 9.2) | 75.0 | 74.8 |
| 3' | 3.70 (1H, м) | 76.1 | 78.2 |
| 4' | 3.47 (1H, м) | 71.9 | 71.2 |
| 5' | 3.62 (1H, м) | 75.2 | 78.3 |
| 6' | 4.50 (1H, дд, J = 2.0, 12.0), 4.25 (1H, дд, J = 5.8, 12.0) | 65.1 | 62.2 |
| 1'' | - | 127.4 ^Г | |
| 2'' | 7.07 ^а (1H, д, J = 2.1) | 115.4 ^Д | |
| 3'' | - | 148.6 ^с | |
| 4'' | - | 146.2 ^ж | |
| 5'' | 6.70 ^б (1H, д, J = 8.0) | 116.9 ^з | |
| 6'' | 6.87 ^в (1H, дд, J = 2.0, 8.0) | 123.5 ^и | |
| 7'' | 7.51 (1H, д, J = 15.9) | 147.4 | |
| 8'' | 6.29 (1H, д, J = 15.9) | 115.1 | |
| 9'' | - | 168.3 | |
| 1''' | - | 127.9 ^Г | |
| 2''' | 7.11 ^а (1H, д, J = 2.0) | 116.3 ^Д | |
| 3''' | - | 149.2 ^с | |
| 4''' | - | 146.8 ^ж | |
| 5''' | 6.75 ^б (1H, д, J = 8.0) | 117.3 ^з | |
| 6''' | 6.92 ^в (1H, дд, J = 2.1, 8.0) | 123.9 ^и | |
| 7''' | 7.59 (1H, д, J = 16.0) | 147.5 | |
| 8''' | 6.31 (1H, д, J = 16.0) | 115.8 | |
| 9''' | - | 168.7 | |

^{а-и} Сигналы могут быть взаимно заменены

Таблица 9 – Спектры ЯМР ^1H (500 МГц, $\text{MeOH-}d_4$, 298 К, δ_{H} , м.д., J/Гц) и ^{13}C (125 Гц, $\text{MeOH-}d_4$, 298 К, δ_{C} , м.д.) соединений 2, 3 и кверцитрина

| С-атом | 2 | | 3 | | Кверцитрин | |
|--------|--|---------------------|--|---------------------|-----------------------------|---------------------|
| | δ_{H} | δ_{C} | δ_{H} | δ_{C} | δ_{H} | δ_{C} |
| 2 | | 157.3 | | 157.9 | | 158.0 |
| 3 | | 134.7 | | 135.2 | | 134.8 |
| 4 | | 178.3 | | 179.0 | | 179.2 |
| 5 | | 162.4 | | 161.9 | | 162.3 |
| 6 | 6.20 (1H, д, J = 2.1) | 99.3 | 6.18 (1H, д, J = 2.0) | 98.7 | 6.21 (1H, д, J = 1.9) | 99.0 |
| 7 | | 165.3 | | 165.0 | | 165.4 |
| 8 | 6.42 (1H, д, J = 2.1) | 94.1 | 6.41 (1H, д, J = 2.0) | 94.0 | 6.38 (1H, д, J = 1.9) | 94.5 |
| 9 | | 156.4 | | 157.2 | | 157.0 |
| 10 | | 104.6 | | 104.9 | | 105.1 |
| 1' | | 120.7 | | 121.2 | | 120.5 |
| 2' | 7.28 (1H, д, J = 2.0) | 116.9 | 7.31 (1H, д, J = 2.0) | 117.3 | 7.30 (1H, д, J = 2.2) | 116.8 |
| 3' | | 145.7 | | 146.0 | | 146.2 |
| 4' | | 148.5 | | 148.2 | | 148.2 |
| 5' | 6.89 (1H, д, J = 8.0) | 116.0 | 6.92 (1H, д, J = 8.0) | 116.7 | 6.86 (1H, д, J = 8.1) | 116.3 |
| 6' | 7.25 (1H, дд, J = 2.0, 8.0) | 122.5 | 7.21 (1H, дд, J = 2.0, 8.0) | 123.0 | 7.29 (1H, дд, J = 2.0, 8.1) | 122.7 |
| 1'' | 5.47 (1H, д, J = 1.5) | 100.2 | 5.49 (1H, д, J = 1.7) | 100.5 | 5.40 (1H, д, J = 1.7) | 102.0 |
| 2'' | 5.31 (1H, м) | 72.4 | 5.35 (1H, м) | 72.6 | 4.18 (1H, м) | 70.6 |
| 3'' | 4.02 (1H, м) | 69.9 | 4.07 (1H, м) | 69.5 | 3.98 (1H, м) | 71.2 |
| 4'' | 3.37 (1H, м) | 72.1 | 4.79 (1H, м) | 73.0 | 3.42 (1H, м) | 71.9 |
| 5'' | 3.57 (1H, м) | 70.6 | 3.69 (1H, м) | 67.5 | 3.62 (1H, м) | 70.5 |
| 6'' | 0.95 (1H, д, J = 6.1) | 17.6 | 0.86 (1H, д, J = 6.1) | 17.0 | 0.91 (1H, д, J = 6.0) | 17.5 |
| 1''' | | 171.3 | | 171.2 | | |
| 2''' | 2.43 (1H, д, J = 15.0), 2.37 (1H, д, J = 15.0) | 45.9 | 2.42 (1H, д, J = 14.9), 2.39 (1H, д, J = 14.9) | 45.7 | | |
| 3''' | | 70.5 | | 69.9 | | |
| 4''' | 2.65 (1H, д, J = 14.0), 2.58 (1H, д, J = 14.0) | 45.4 | 2.69 (1H, д, J = 14.0), 2.61 (1H, д, J = 14.0) | 45.3 | | |
| 5''' | | 176.5 | | 175.9 | | |
| 6''' | 1.05 (3H, с) | 27.3 | 1.09 (3H, с) | 27.3 | | |
| 1'''' | | | | 171.7 | | |
| 2'''' | | | 2.32 (1H, д, J = 15.1), 2.29 (1H, д, J = 15.1) | 46.3 | | |
| 3'''' | | | | 70.4 | | |
| 4'''' | | | 2.58 (1H, д, J = 14.1), 2.53 (1H, д, J = 14.1) | 46.0 | | |
| 5'''' | | | | 176.3 | | |
| 6'''' | | | 1.11 (3H, с) | 27.6 | | |

Таким образом из листьев брусники выделены новые соединения – вакцинизиды А–С (1–3), идентифицированные по данным химических превращений, УФ, ИК, ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии как 2',6'-ди-О-кофеил-арбутин (1), кверцетин-3-О-{2''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}- α -L-рамнопиранозид (2) и кверцетин-3-О-{2''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)-4''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}- α -L-рамнопиранозид(3).

3.5. Выделение веществ фенольной природы из брусники обыкновенной побегов

После предварительного хроматографического анализа нами было выделено из побегов брусники 17 соединений. Схема выделения представлена на рисунке 16.

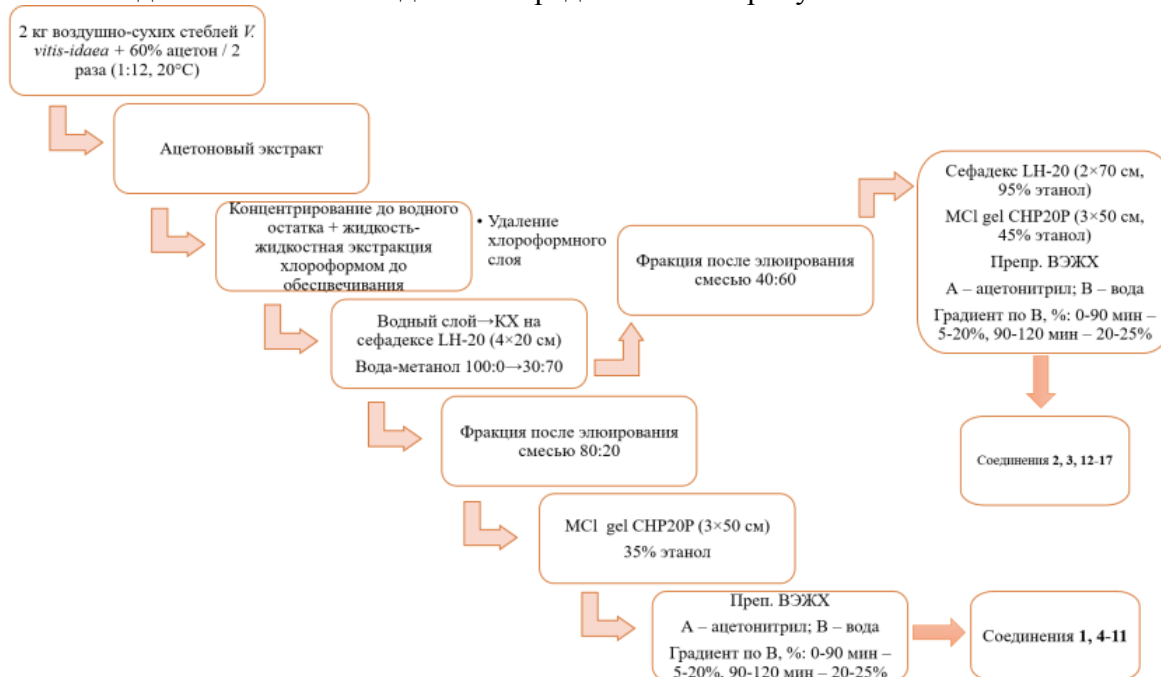


Рисунок 16 – Схема выделения фенольных соединений из стеблей *Vaccinium vitis-idaea* L.

Ацетоновый экстракт побегов *V. vitis-idaea* разделяли на Сефадексе LH-20, MCI gel CHP20P и преп. ВЭЖХ, что привело к выделению таких известных соединений, как (+)-катехин (4), (-)-эпикатехин (5), (+)-галлокатехин (6), (-)-эпигаллокатехин (7), (+)-галлокатехин галлат (8), (-)-эпигаллокатехин галлат (9), (+)-катехин-3-О-глюкозид (10), (+)-катехин-3-О-рамнозид (11), процианидины В1 (12), В2 (13), В3 (14), В4 (15), (-)-эпикатехин-(4 α →8)-(+)-катехин (16) и процианидин В3-3-О-рамнозид (17), а также трех новых катехин-О-гликозидов 1–3. Соединения 4 и 5 ранее были обнаружены в побегах *V. vitis-idaea*, собранной в Румынии, 6, 7, 12, 14 – в побегах *V. vitis-idaea*, а присутствие 8–11, 13, 15–17 выявлено в данном виде впервые. В результате хроматографического разделения ацетонового извлечения побегов *Vaccinium vitis-idaea* L. были выделены новые катехин-О-гликозиды, идентифицированные по данным УФ, ИК, ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии как (-)-эпикатехин-3-О- α -L-рамнопиранозид (вакцинизид D, 1), (+)-катехин-3-О-{4''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}- α -L-рамнопиранозид (вакцинизид E, 2) и (+)-катехин-3-О-(2'',4''-ди-О-галлоил)- α -L-рамнопиранозид.

Водный слой хроматографировали на Сефадексе LH-20 (4×70 см, H₂O–MeOH 100:0→30:70). Фракции с Сефадекса LH-20, элюируемые 20% MeOH, разделяли на MCI gel CHP20P (3×50 см, 35% EtOH) и преп. ВЭЖХ (элюент А – MeCN, элюент В – H₂O; градиентный режим, % В: 0–90 мин 5–20%, 90–120 мин 20–25%), что позволило выделить 1 (18 мг), (+)-катехин (20.6 г, 4), (-)-эпикатехин (1.2 г, 5), (+)-галлокатехин (28 мг, 6), (-)-эпигаллокатехин (6 г, 7), (+)-галлокатехин галлат (5 мг, 8), (-)-эпигаллокатехин галлат (3 мг, 9), (+)-катехин-3-О-глюкозид (7 мг, 10) и (+)-катехин-3-О-рамнозид (52 мг, 11). Фракции с Сефадекса LH-20, элюируемые 60% MeOH, рехроматографировали на Сефадексе LH-20 (2×70 см, 95% EtOH), MCI gel CHP20P (3×50 см, 45% EtOH) и преп. ВЭЖХ (элюент А – MeCN, элюент В – H₂O; градиентный режим, % В: 0–30 мин 5–35%, 30–45 мин 35–45%, 45–100 мин 45–70%, 100–150 мин 70–86%). В результате были получены 2 (42 мг), 3 (22 мг), процианидины В1 (7.7 г, 12), В2 (143

мг, 13), В3 (26.4 г, 14), В4 (25 мг, 15), (-)-эпикатехин-(4 α →8)-(+)-катехин (6 мг, 16), процианидин В3-3-О-рамнозид (192 мг, 17).

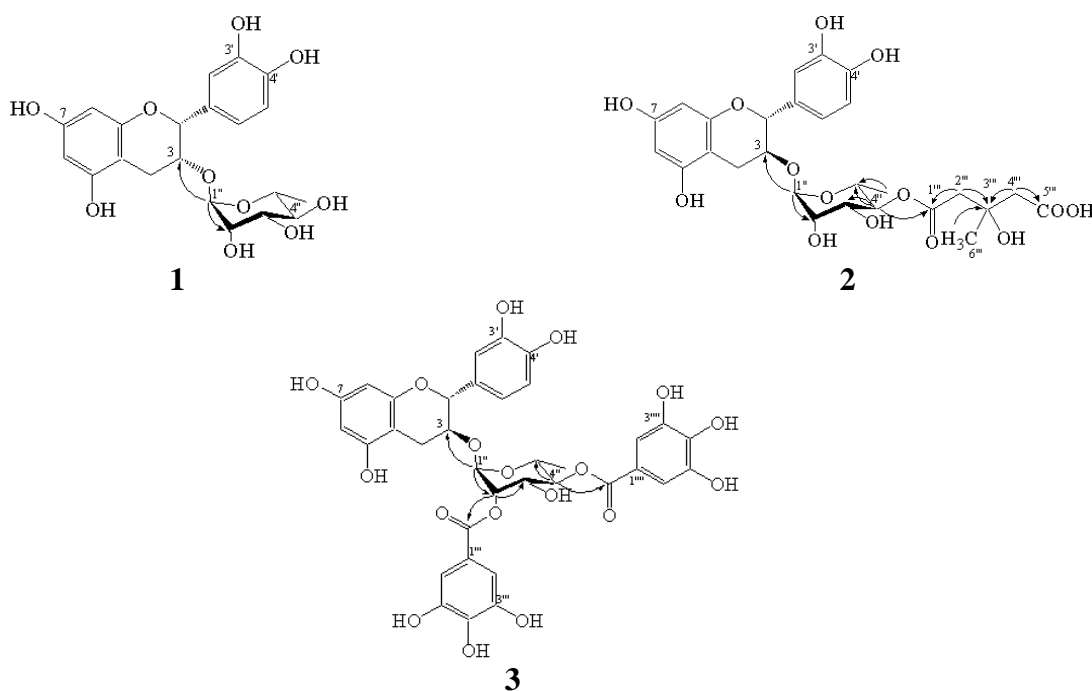


Рисунок 17 – Новые соединения из побегов *Vaccinium vitis-idaea* L.

Вакцинизид D (1). C₂₁H₂₄O₁₀. УФ-спектр (MeOH, λ_{\max} , нм): 278. HR-ESI-MS, m/z : 459.2511 [M+Na]⁺ (расч. 459.3686 для C₂₁H₂₄O₁₀Na). ESI-MS, m/z (%): 459 [M+Na]⁺ (100), 437 [M+H]⁺ (14), 291 [(M+H)-C₆H₁₀O₄]⁺ (57). Спектр ЯМР ¹H (500 МГц, MeOH-*d*₄, 298 К, δ_{H} , м.д.). Спектр ЯМР ¹³C (125 МГц, MeOH-*d*₄, 298 К, δ_{C} , м.д.) (табл. 10).

Вакцинизид E (2). C₂₇H₃₂O₁₄. УФ-спектр (MeOH, λ_{\max} , нм): 277. HR-ESI-MS, m/z : 579.4239 [M-H]⁻ (расч. 579.4870 для C₂₇H₃₁O₁₄). ESI-MS, m/z (%): 579 [M-H]⁻ (100), 289 [(M-H)-C₆H₈O₄-C₆H₁₀O₄]⁻ (32). MS²: [579] 517 [(M-H)-CH₂O₃]⁻ (25), 477 [(M-H)-CH₂O₃-C₃H₄]⁻ (38), 435 [(M-H)-CH₂O₃-C₃H₄-C₂H₂O]⁻ (63), 289 [(M-H)-CH₂O₃-C₃H₄-C₂H₂O-C₆H₁₀O₄]⁻ (100). ИК-спектр (ν , см⁻¹): 1722, 1648. Спектр ЯМР ¹H (500 МГц, MeOH-*d*₄, 298 К, δ_{H} , м.д.). Спектр ЯМР ¹³C (125 МГц, MeOH-*d*₄, 298 К, δ_{C} , м.д.) (табл. 10).

Вакцинизид F (3). C₃₅H₃₂O₁₈. УФ-спектр (MeOH, λ_{\max} , нм): 273. HR-ESI-MS, m/z : 739.5003 [M-H]⁻ (расч. 739.5598 для C₃₅H₃₁O₁₈). ESI-MS, m/z (%): 739 [M-H]⁻ (100), 587 [(M-H)-C₇H₄O₄]⁻ (9), 435 [(M-H)-2×C₇H₄O₄]⁻ (26), 289 [(M-H)-2×C₇H₄O₄-C₆H₁₀O₄]⁻ (52). ИК-спектр (ν , см⁻¹): 1722, 1651. Спектр ЯМР ¹H (500 МГц, MeOH-*d*₄, 298 К, δ_{H} , м.д.). Спектр ЯМР ¹³C (125 МГц, MeOH-*d*₄, 298 К, δ_{C} , м.д.) (табл. 10).

Ферментативный гидролиз проводили с α -рамнозидазой (**1**; **2** предварительно инкубировали с 0.05 М NaOH при 20°C 2 ч) и танназой (**3**). В продуктах гидролиза **1** (2 мг) обнаружены (-)-эпикатехин (хиральная ВЭЖХ, t = 25.5 мин) и L-рамноза, **2** (2 мг) – (+)-катехин (хиральная ВЭЖХ, t = 51.3 мин) и L-рамноза, **3** (10 мг) – (+)-катехин-3-О-рамнозид (3 мг, **11**; ВЭЖХ-МС, ЯМР, гидролиз с α -рамнозидазой) и галловую кислоту (ВЭЖХ-МС).

(+)-Катехин-3-О-рамнозид (11). C₂₁H₂₄O₁₀. УФ-спектр (MeOH, λ_{\max} , нм): 278. HR-ESI-MS, m/z : 437.3224 [M+H]⁺ (расч. 437.3866 для C₂₁H₂₅O₁₀). ESI-MS, m/z (%): 437 [M+H]⁺ (100), 289 [(M+H)-C₆H₁₀O₄]⁺ (37). Спектр ЯМР ¹H (500 МГц, MeOH-*d*₄, 298 К, δ_{H} , м.д.): 4.52 (1H, д, J = 8.1, H-2), 3.90 (1H, м, H-3), 2.47 (1H, дд, J = 8.3, 16.0, H-4b), 2.89 (1H, дд, J = 5.0, 16.0, H-4a), 6.03 (1H, д, J = 2.0, H-6), 5.95 (1H, д, J = 2.0, H-8), 7.02 (1H, д, J = 2.0, H-2'), 6.81 (1H, д, J = 8.1, H-5'), 6.70 (1H, дд, J = 2.0, 8.1, H-6'), 5.39 (1H, д, J = 1.8, H-1''), 4.25 (1H, м, H-2''), 3.93 (1H, м, H-3''), 3.45 (1H, м, H-4''), 3.67 (1H, м, H-5''), 0.90 (1H, д, J = 6.1, H-6''). Спектр ЯМР ¹³C (125 МГц, MeOH-*d*₄, 298 К, δ_{C} , м.д.): 80.3 (C-2), 74.4 (C-3), 27.2 (C-4), 156.9 (C-5), 95.0 (C-6), 158.0 (C-7), 96.3 (C-8), 156.1 (C-9), 100.5 (C-10), 132.6 (C-1'), 115.8 (C-2'), 145.6 (C-3'), 145.3 (C-4'), 115.5 (C-5'), 120.4 (C-6'), 102.4 (C-1''), 70.2 (C-2''), 71.0 (C-3''), 71.5 (C-4''), 70.2 (C-5''), 17.7 (C-6'').

Таблица 10 – Спектры ЯМР ^1H (500 МГц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_{H} , м.д., J/Гц) и ^{13}C (125 Гц, MeOH- d_4 , 298 К, δ_{C} , м.д.) соединений 1–3

| С-атом | 1 | | 2 | | С-атом | 3 | |
|--------|--|---------------------|--|---------------------|------------|--|---------------------|
| | δ_{H} | δ_{C} | δ_{H} | δ_{C} | | δ_{H} | δ_{C} |
| | (-)-Эпикатехин | | (+)–Катехин | | | (+)–Катехин | |
| 2 | 4.89 (1H, д, J = 2.0) | 76.3 | 4.50 (1H, д, J = 8.0) | 80.1 | 2 | 4.57(1H, д, J = 8.0) | 80.6 |
| 3 | 4.25 (1H, м) | 73.0 | 3.92 (1H, м) | 74.8 | 3 | 3.89(1H, м) | 74.6 |
| 4 | 2.69 (1H, дд, J = 4.0, 17.0) 2.89 (1H, дд, J = 4.0, 17.0) | 28.3 | 2.48 (1H, дд, J = 8.5, 16.1) 2.87 (1H, дд, J = 5.4, 16.1) | 27.4 | 4 | 2.45(1H, дд, J = 8.4, 16.0) 2.89(1H, дд, J = 5.5, 16.0) | 28.3 |
| 5 | | 156.7 | | 156.8 | 5 | | 157.5 |
| 6 | 6.00 (1H, д, J = 2.1) | 95.7 | 6.02 (1H, д, J = 2.0) | 95.2 | 6 | 6.04(1H, д, J = 2.1) | 95.0 |
| 7 | | 158.6 | | 158.1 | 7 | | 158.3 |
| 8 | 5.99 (1H, д, J = 2.1) | 96.3 | 5.93 (1H, д, J = 2.0) | 96.1 | 8 | 5.97(1H, д, J = 2.1) | 96.4 |
| 9 | | 156.1 | | 156.4 | 9 | | 156.2 |
| 10 | | 100.4 | | 100.3 | 10 | | 100.7 |
| 1' | | 132.0 | | 132.1 | 1' | | 131.8 |
| 2' | 7.06 (1H, д, J = 2.0) | 115.9 | 6.99 (1H, д, J = 1.9) | 115.6 | 2' | 7.02 (1H, д, J = 2.0) | 115.7 |
| 3' | | 145.9 | | 145.8 | 3' | | 145.9 |
| 4' | | 145.6 | | 145.6 | 4' | | 145.7 |
| 5' | 6.85 (1H, д, J = 8.1) | 115.2 | 6.77 (1H, д, J = 8.2) | 115.3 | 5' | 6.79 (1H, д, J = 8.0) | 115.2 |
| 6' | 6.74 (1H, дд, J = 2.0, 8.1) | 120.4 | 6.71 (1H, дд, J = 1.9, 8.2) | 120.3 | 6' | 6.68 (1H, дд, J = 2.0, 8.0) | 120.4 |
| | 3-O- α -L-Рамнопираноза | | 3-O- α -L-Рамнопираноза | | | 3-O- α -L-Рамнопираноза | |
| 1'' | 5.40 (1H, д, J = 1.7) | 102.5 | 5.45 (1H, д, J = 1.6) | 101.6 | 1'' | 5.52 (1H, д, J = 1.5) | 100.7 |
| 2'' | 4.21 (1H, м) | 70.7 | 4.10 (1H, м) | 69.9 | 2'' | 5.39 (1H, м) | 73.2 |
| 3'' | 3.94 (1H, м) | 71.1 | 3.92 (1H, м) | 67.9 | 3'' | 4.11 (1H, м) | 69.2 |
| 4'' | 3.40 (1H, м) | 71.7 | 4.80 (1H, м) | 73.3 | 4'' | 4.85 (1H, м) | 73.5 |
| 5'' | 3.69 (1H, м) | 70.6 | 3.65 (1H, м) | 67.3 | 5'' | 3.62 (1H, м) | 67.2 |
| 6'' | 0.87 (1H, д, J = 5.9) | 17.9 | 0.89 (1H, д, J = 6.0) | 17.2 | 6'' | 0.91 (1H, д, J = 6.1) | 17.0 |
| | | | 4''-O-(3'''-Гидрокси-3'''-метилглутароил) | | | 2''-O-Галлоил | |
| 1''' | | | | 171.8 | 1''' | | 121.9 ^б |
| 2''' | | | 2.38 (1H, д, J = 15.0), 2.25 (1H, д, J = 15.0) | | 2''', 6''' | 7.03 (2H, с) ^а | 109.7 ^в |
| 3''' | | | | 68.4 | 3''', 5''' | | 146.3 ^г |
| 4''' | | | 2.71 (1H, д, J = 14.2), 2.57 (1H, д, J = 14.2) | | 4''' | | 138.4 ^а |
| 5''' | | | | 175.5 | 7''' | | 167.5 |
| 6''' | | | 1.11 (3H, с) | | | 4''-O-Галлоил | |
| | | | | | 1'''' | | 122.2 ^б |
| | | | | | 2''', 6''' | 7.05 (2H, с) ^а | 110.3 ^в |
| | | | | | 3''', 5''' | | 146.7 ^г |
| | | | | | 4'''' | | 138.7 ^а |
| | | | | | 7'''' | | 167.9 |

^{а-д} Сигналы могут быть взаимно заменены.

В результате хроматографического разделения ацетонового извлечения побегов брусники обыкновенной были выделены новые катехин-О-гликозиды, идентифицированные по данным УФ, ИК, ЯМР спектроскопии и масс-спектрометрии как (-)-эпикатехин-3-О- α -L-рамнопиранозид (вакцинизид D, 1), (+)-катехин-3-О-{4''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}- α -L-рамнопиранозид (вакцинизид E, 2) и (+)-катехин-3-О-(2'',4''-ди-О-галлоил)- α -L-рамнопиранозид (вакцинизид F, 3).

3.6. Выделение веществ фенольной природы из травы видов *Prunella L.*

В результате хроматографического разделения компонентов спиртового извлечения из травы *P. grandiflora* которое проводили с применением КХ на полиамиде, Сефадексе LH-20, нормально- и обращено-фазовом силикагеле и препаративной ВЭЖХ (рис.14).

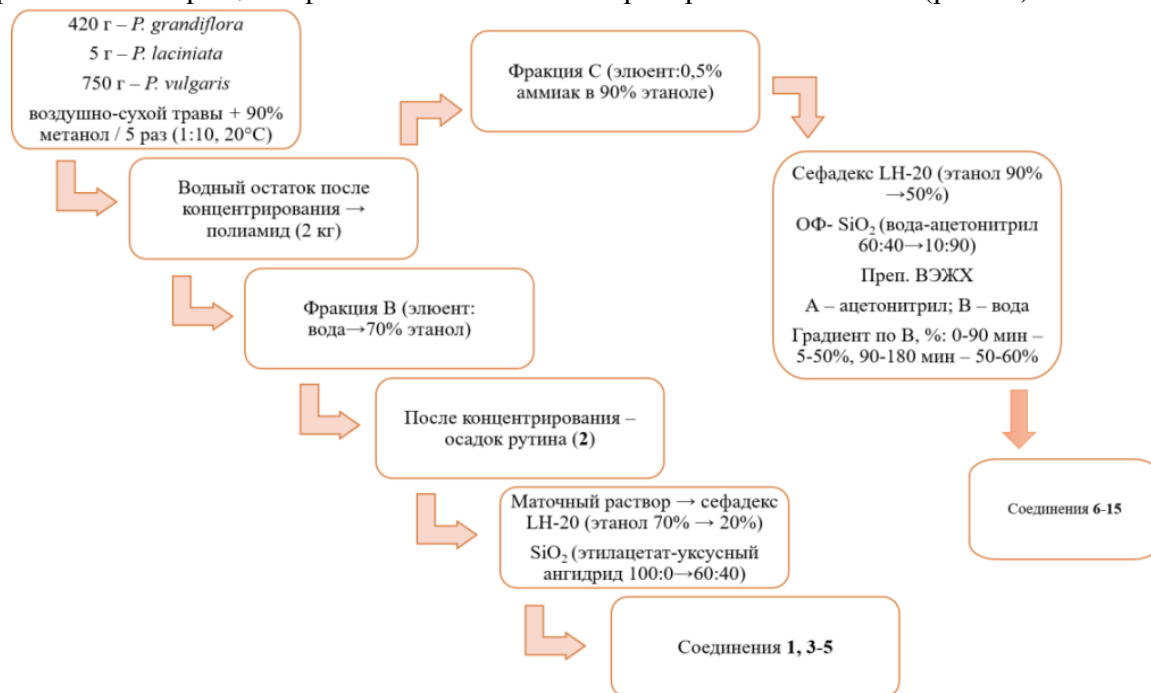


Рисунок 14 – Схема выделения фенольных соединений из травы видов рода *Prunella L.*

В результате хроматографирования удалось выделить рутин (2), астрагалин (3), кверцетин (4), кемпферол (5), 2-О-кофеил-треоновую кислоту (6), 3-О-кофеил-треоновую кислоту (7), 5-О-кофеил-хинную кислоту (8), кофейную кислоту (9), розмариновой кислоты 3'-О-глюкозид (10), кверцетин-3-О-{6''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-глюкозид (11), литоспермовую кислоту (12), розмариновую кислоту (13), сальвианоловые кислоты А (14) и В (15) и новый флавоноид 1 (рис. 15).

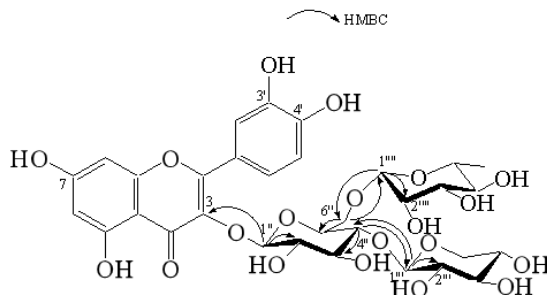


Рисунок 15 – Новое соединение (1) из травы *Prunella grandiflora L.*

Из травы *P. laciniata* были выделены 1, 3, 5, 7–11, 13 и кверцетин-7-О-рутинозид (16); из *P. vulgaris* – 1–4, 6–15, никотифлорин (17) и рейноутрин (18). Ранее в *P. grandiflora* и *P. laciniata*

были описаны 2, 4, 9 и 13, в *P. vulgaris* – 2–5, 8, 9 и 13. Впервые показано присутствие 3, 5–7, 10–12, 14, 15 в *P. grandiflora*, 3, 5, 7, 10, 11 в *P. laciniata*, 6, 7, 10–12, 14, 15, 17, 18 в *P. vulgaris*.

Кверцетин 3-О-(4''-О-β-D-ксилопиранозил-6''-О-α-L-рамнопиранозил)-β-D-глюкопиранозид (1). C₃₂H₃₈O₂₀. УФ-спектр (MeOH, λ_{max}, нм): 256, 267, 350. HR-ESI-MS, *m/z*: 743.5211 [M+H]⁺ (расч. 743.5914 для C₃₂H₃₉O₂₀ [M+H]⁺). ESI-MS, *m/z* (%): 743 [M+H]⁺ (100), 611 [(M+H)-ксилозил]⁺ (31), 597 [(M+H)-рамнозил]⁺ (2), 465 [(M+H)-ксилозил-рамнозил]⁺ (25), 303 [(M+H)-ксилозил-рамнозил-глюкозил]⁺ (17). Спектр ЯМР ¹H (500 МГц, DMSO-*d*₆, 298 К, δ_H, м.д.). Спектр ЯМР ¹³C (125 МГц, DMSO-*d*₆, 298 К, δ_C, м.д.) (табл. 11).

Таблица 11 – Спектры ЯМР ¹H (500 МГц, DMSO-*d*₆, 298 К, δ_H, м.д., J/Гц) и ¹³C (125 МГц, DMSO-*d*₆, 298 К, δ_C, м.д.) соединения 1 (черноголовка крупноцветковая)

| C-атом | δ _H | δ _C |
|--------|--|----------------|
| 2 | | 157.2 |
| 3 | | 134.6 |
| 4 | | 177.6 |
| 5 | | 160.8 |
| 6 | 6.10 (1H, д, J = 1.9) | 99.1 |
| 7 | | 163.6 |
| 8 | 6.41 (1H, д, J = 1.9) | 94.8 |
| 9 | | 155.8 |
| 10 | | 103.6 |
| 1' | | 120.2 |
| 2' | 7.70 (1H, д, J = 2.0) | 116.7 |
| 3' | | 145.0 |
| 4' | | 148.4 |
| 5' | 6.92 (1H, д, J = 8.1) | 116.0 |
| 6' | 7.52 (1H, дд, J = 2.0, 8.1) | 124.1 |
| | 3-О-β-D-Glcp | |
| 1'' | 5.12 (1H, д, J = 7.2) | 100.5 |
| 2'' | 3.47 (1H, м) | 75.6 |
| 3'' | 3.45 (1H, м) | 77.0 |
| 4'' | 3.57 (1H, м) | 72.0 |
| 5'' | 3.38 (1H, м) | 76.5 |
| 6'' | 3.52 (1H, дд, J = 12.0, 5.0); 3.81 (1H, дд, J = 12.0, 1.2) | 67.5 |
| | 4''-О-β-D-Xylp | |
| 1''' | 4.79 (1H, д, J = 7.1) | 104.6 |
| 2''' | 3.35 (1H, м) | 74.2 |
| 3''' | 3.36 (1H, м) | 76.4 |
| 4''' | 3.55 (1H, м) | 70.3 |
| 5''' | 3.27 (1H, м), 4.01 (1H, м) | 65.2 |
| | 6''-О-α-L-Rhap | |
| 1'' | 4.53 (1H, д, J = 1.9) | 101.7 |
| 2'' | 3.63 (1H, м) | 71.5 |
| 3'' | 3.50 (1H, м) | 71.8 |
| 4'' | 3.23 (1H, м) | 73.7 |
| 5'' | 3.40 (1H, м) | 69.4 |
| 6'' | 1.11 (1H, д, J = 6.8) | 17.5 |

Исследование фенольных соединений трех видов рода *Prunella* L. (черноголовка крупноцветковая, черноголовка разрезная и черноголовка обыкновенная) привело к выделению 18 соединений, включая новый флавоноид 1. С применением данных УФ-, ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии было установлено, что 1 представляет собой кверцетин 3-О-(4''-О-β-D-ксилопиранозил-6''-О-α-L-рамнопиранозил)-β-D-глюкопиранозид.

4. Полисахаридный, белковый и минеральный состав видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L.

На следующем этапе работы нами были проанализированы биополимеры и минеральный состав всех исследуемых объектов. Для фракций полисахаридов видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L., и *Prunella* L., установлены физико-химические показатели, такие как средняя молекулярная масса, изоэлектрическая точка, коэффициент распределения, поверхностная активность и сорбционная способность. Полученные результаты имеют важное значение при разработке лекарственной формы.

Содержание фракции водорастворимых полисахаридов (ВРПС) в толокнянке листьях варьируется от 0,9 до 1,2%, фракции пектиновых веществ (ПВ) от 3,0 до 8,8%. Наибольшим содержанием ПВ характеризовались толокнянки кавказской листья – 8,8%.

Мономерный состав полученных фракций из листьев видов толокнянки представлен арабинозой, галактозой, глюкозой, рамнозой, маннозой, ксилозой, галактуроновой и глюкуроновыми кислотами. Для фракции ВРПС основными компонентами являлись арабиноза, галактоза и глюкоза, для фракции ПВ – арабиноза, галактуроновая кислота и галактоза.

В сырье видов рода *Vaccinium* L. полисахариды представлены фракциями ВРПС и ПВ, содержание ВРПС варьирует от 0,8% до 2 %, ПВ - от 0,8% до 3,3%. Мономерный состав полученных фракций из сырья видов рода *Vaccinium* L. представлен для фракции ВРПС арабинозой и галактозой, для фракции ПВ – арабинозой, галактозой и галактуроновой кислотой.

В траве рода *Prunella* L. полисахариды представлены фракциями ВРПС и ПВ, их содержание для черноголовки обыкновенной травы колебалось от 8,0% до 14,0 % для ВРПС, для ПВ от 9,0% до 15,3%. Для фракции ВРПС основными мономерами являлись ксилоза, галактоза и арабиноза; для фракции ПВ – галактоза, арабиноза и галактуроновая кислота.

В листьях видов *Arctostaphylos* Adans. установлено наличие 16 аминокислот. Содержание суммы аминокислот в толокнянке листьях колебалось от 5,0 до 5,4%, основными по содержанию аминокислотами являлись глутаминовая, аспарагиновая кислоты и лейцин. Содержание сырого протеина в толокнянке достигало 6,6 %.

Основными по содержанию аминокислотами для сырья видов рода *Vaccinium* L., являлись глутаминовая, аспарагиновая кислоты и лейцин. Сумма аминокислот для анализируемых видов рода колебалась от 5,5% до 8,4%, содержание сырого протеина от 6,4% до 9,2%.

Основными по содержанию аминокислотами для сырья видов рода *Prunella* L., являлись глутаминовая, аспарагиновая кислоты и лейцин. Сумма аминокислот для анализируемых видов рода колебалась от 4,7% до 5,6%, содержание сырого протеина - от 5 % до 6,8%.

При оценке содержания минеральных компонентов было установлено, что во всех изучаемых объектах в большом количестве присутствуют кальций, калий, магний. В траве видов рода *Prunella* L. также высокое содержание кремния.

5. Разработка методик стандартизации и установление норм качества сырья видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L.

Одним из основных показателей качества ЛРС, в разделе «Испытания», в современной фармакопейной статье является количественное содержание основного класса БАВ, а также его доминирующих соединений. Именно основной класс БАС и его компоненты являются определяющими в терапевтической активности ЛРС и субстанций на их основе. Для рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. основным классом, отвечающим за терапевтическое действие, являются фенольные соединения.

Таким образом, в результате фитохимического анализа исследуемых объектов предложен дальнейший анализ фенольных соединений по доминирующему компоненту, который может быть при этом основным по количественному содержанию среди остальных фенольных соединений.

По совокупности результатов эксперимента предложено использование метода спектрофотометрии для расчета количественного содержания суммы фенольных соединений в пересчете на фенологликозид для рода *Arctostaphylos* Adans. - арбутин, или на фенолокислоту – хлорогеновую кислоту для рода *Vaccinium* L, а также в пересчете на розмариновую кислоту для

рода *Prunella* L. Для оценки количественного содержания суммы флавоноидов предложено использование известной спектрофотометрической методики, основанной на их взаимодействии с хлоридом алюминия. Также для количественной оценки содержания маркерного и/или доминирующего соединения нами предлагается использовать сепарационные методы анализа – капиллярный электрофорез (КЭ) и высокоэффективную жидкостную хроматографию (ВЭЖХ).

Разработанные методики валидированы по основным показателям (специфичность, линейность, правильность и прецизионность) согласно современным требованиям ГФ РФ XIV издания. Предложенные методики количественного определения арбутина с использованием спектрофотометрии были включены в ФС.2.5.0099.18 «Толокнянки обыкновенной листья» и ФС.2.5.0063.18 «Брусники обыкновенной листья» ГФ РФ XIV издания, а также методики определения хлорогеновой и розмариновой кислоты, суммарного содержания фенольных соединений и флавоноидов вошли в проекты ФС на исследуемые виды растительного сырья (табл. 12).

С целью усовершенствования ФС официальных видов ЛРС и разработки проектов ФС неофициальных видов растительного сырья, не вошедших в ГФ РФ XIV издания, для некоторых видов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. были установлены следующие нормы качества: влажность; зола общая; зола, нерастворимой в хлористоводородной кислоте; экстрактивные вещества (табл. 12), пределы для показателя «Измельченность» и посторонних примесей. Установлены сроки хранения сырьевых источников *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. Исследования по проведению долгосрочных испытаний стабильности для всех объектов проводили на 3-х образцах для каждого вида. Хранили образцы при температуре 25°C/отн. влажн. 60%. Для всех анализируемых объектов наблюдалось до 12% снижения основных соединений в течении 3-х лет. Таким образом все анализируемые объекты остаются стабильными в течении 3-х лет (табл. 12).

ЛРС чаще всего используется в высушенном виде, реже применяются в свежем состоянии. Сохранность той или иной группы БАВ достигается путем подбора различных видов сушки. С целью консервации максимального количества основных групп соединений фенольной природы нами использовались варианты естественной (воздушно-теневого способ) и искусственной (конвективная и инфракрасная) сушки при различных температурах. В результате было установлено, что для сырья видов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. при использовании искусственных видов сушки наблюдается снижение содержания фенольных соединений, в связи с чем допускается только сушка воздушно-теневого способом. Однако для сырьевых источников рода *Prunella* L. допускается использования конвективной сушки при температуре 40 °С.

6. Исследование фармакологической активности сырья видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L.

Изучение фармакологической активности сырья видов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L., *Prunella* L. носило комплексный характер с оценкой острой токсичности, антиоксидантной, нейропротекторной, диуретической, актопротекторной и антигиперлипидемической видов активности.

В ходе оценки безопасности применения сухих экстрактов, полученных из стандартизированного сырья представителей родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L., *Prunella* L. в остром эксперименте было установлено, что все анализируемые объекты выдерживали тест предельной дозы процедуры оценки острой токсичности «Вверх-вниз». В итоге за показатель LD₅₀ для анализируемых сухих экстрактов принимали 2000 мг/кг, что соответствовало V классу токсичности по GSH классификации и характеризует исследуемые объекты как низкотоксичные.

Антиоксидантную активность анализировали в условиях *in vitro* и *in vivo* тестов, что соответствует прямым и непрямым антиоксидантным свойствам. В итоге показано, что в ряду анализируемых объектов наиболее выраженные антиоксидантные свойства демонстрируют изучаемые сухие экстракты, полученные путем экстракции 40% и 70% спиртом этиловым. В условиях *in vitro* теста данные объекты подавляли генерацию DPPH, супероксид, гидроксил и нитрозил радикалов с показателями IC₅₀ достоверно более низкими, чем в случае остальных анализируемых сухих экстрактов. Также курсовое введение данных объектов в дозе 100 мг/кг

повышало активность ферментов эндогенной антиоксидантной защиты: супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы, каталазы и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, а также приводило к уменьшению содержания прооксидантов – активных продуктов, реагирующих с 2-тиобарбитуровой кислотой и диеновых конъюгатов.

Оценку нейропротекторной активности осуществляли на модели перманентной окклюзии средней мозговой артерии с определением изменения зоны некроза головного мозга и скорости церебрального кровотока. Было показано, что применение сухих экстрактов, полученных путем экстракции 40% и 70% спиртом этиловым в дозе 100 мг/кг оказывают нейропротекторное действие, выражаемое в достоверном повышении (в сравнении с группой животных, не получавших терапию) скорости мозгового кровотока и снижении зоны инфаркта мозга, тогда как при введении остальных изучаемых сухих экстрактов достоверных изменений оцениваемых показателей отмечено не было. Необходимо подчеркнуть, что нейропротекторное действие анализируемых сухих экстрактов, полученных путем экстракции 40% и 70% спиртом этиловым, было сопоставимо с препаратом сравнения – экстрактом гинкго билоба EGB 671.

Изучение актопротекторной активности сырья видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L., *Prunella* L. на модели истощающих физических нагрузок показало, что на наиболее значимые изменения уровня физической работоспособности животных отмечены при введении сухих экстрактов, полученных путем экстракции 40% и 70% спиртом этиловым в дозе 100 мг/кг. Применение данных сухих экстрактов 10-ти дневным курсом приводило к сопоставимому с референтом (настойка женьшеня) изменению продолжительности плавания крыс.

Оценка диуретического действия позволила установить, что данным видом фармакологической активности в большей степени обладают сухие экстракты, полученные экстракцией водой очищенной. Также учитывая изменение электролитного профиля плазмы крови можно предполагать наличие у анализируемых объектов калий-сберегающего характера действия.

Все анализируемые сухие экстракты характеризовались антитирозидазными свойствами, уступающими койевой кислоте. При этом определенная тенденция увеличения антитирозидазной активности была отмечена у сухих экстрактов, полученных экстракцией 40% спиртом этиловым. По результатам проведенного фармакологического изучения сухих экстрактов, полученных из представителей рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L., *Prunella* L. предполагается поливалентный профиль активности анализируемых объектов, зависящий, прежде всего, от выбора экстрагента и, соответственно, извлекаемой группы веществ.

7. Методологический подход к исследованию ЛРС, содержащего преимущественно фенольные соединения на примере некоторых видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L.

В результате комплексного исследования сырьевых источников, содержащих в качестве ведущей группы БАС - фенольные соединения, был разработан методологический подход исследования ЛРС (рис.16). Воспроизводимость методологии была опробована на растениях из различных семейств и родов, включавшая фармакопейные и нефармакопейные виды ЛРС

1. На первом этапе исследования лекарственного растения определяют места его естественного произрастания, ресурсы, возможность введения в культуру (на основании литературных или собственных исследований);

2. Экспериментально определяют время сбора ЛРС и условия его сушки (при использовании естественной сушки (воздушно-теновой) и искусственной (конвективной и инфракрасной сушки при температурах от 40 до 70 °С, с шагом в 10 °С).

3. Устанавливают подлинность производящего растения и его сырья по внешним и анатомическим признакам. Для растений, имеющих близкородственные виды или способных образовывать гибридные формы, допустимо применения ДНК-штрихкодирования.

4. Фитохимический анализ проводят с использованием современных инструментальных методов анализа и на основе полученных данных вносят изменения в существующие методики стандартизации ЛРС. Фитохимический скрининг нефармакопейных

видов сырья так же проводят с учетом современных аналитических приборов и методик с последующей разработкой норм качества для внесения их в проект ФС.

5. Для внесения в проект ФС на ЛРС устанавливают показатель «Определение основных групп биологически активных веществ» с помощью качественных реакций или метода ТСХ по характеру и наличию пятен на хроматографической пластинке.

6. Разрабатывают методики качественного и количественного содержания БАС с последующим определением фармакологической активности для сырья с профилем фенольных соединений. Для сырья с неизвестным химическим составом устанавливают качественный и количественный состав с использованием методов ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-ДАД и масс-спектрометрии. На основе полученных данных разрабатывают методики качественного, количественного содержания фенольных соединений для внесения в проект ФС и проводят мониторинг фармакологической активности.

7. При обнаружении веществ в смеси фенольных соединений, ранее не описанных в литературе, их выделяют и устанавливают структуру при использовании колоночной хроматографии, ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-ДМД, масс-спектрометрии, спектроскопии ЯМР, ИК-спектрометрии; подвергают стандартизации и рекомендуют при необходимости в качестве фармакопейных образцов; подвергают исследованию фармакологической активности.

8. Стандартизацию сырья следует проводить: по суммарному содержанию фенологликозидов, фенолокислот или флавоноидов по предварительно разработанной и валидированной методике количественного определения с использованием спектрофотометрии в УФ- и видимой области, в пересчете на доминирующий в смеси компонент; по индивидуальному компоненту с использованием ранее разработанной и валидированной методике с использованием сепарационных методов анализа – ВЭЖХ и КЭ.

9. Фармакопейную статью на сырье с установленными нормами качества (влажность, зола, экстрактивные вещества, сроки годности, условия сушки и заготовки) в плановом порядке подвергают пересмотру с учетом современных инструментальных методов и вносят соответствующие изменения. Для проектов ФС, вводимых впервые на новые виды сырья, нормы качества устанавливают на сериях ЛРС, заготовленных из 5 и более мест естественного произрастания или от культивируемых растений.

10. Определяют содержание биополимеров: полисахаридов и белков как основных компонентов экстракционных лекарственных форм, которые в том числе являются фармакологически активными группами БАС (в зависимости от количественного содержания).

А. Для полисахаридов, содержащихся в сырье: после выделения фенольной фракции из шрота получают ВРПС и ПВ, определяют количественное содержание; устанавливают физико-химические константы полисахаридных фракций (среднюю молекулярную массу, поверхностную активность, изоэлектрическую точку, коэффициент распределения и для ПВ сорбционную способность); после гидролиза устанавливают качественный и количественный мономерный состав фракций методами ТСХ и ВЭЖХ.

Б. Для белков, содержащихся в сырье: после гидролиза выделенного белка определяют качественный и количественный состав аминокислот.

11. Определяют качественный и количественный состав других классов БАС, содержащихся в исследуемом образце, с использованием методов ТСХ, ВЭЖХ, СФ, и КЭ.

А. При обнаружении в смеси новых соединений, ранее не описанных в литературе, их: выделяют и устанавливают структуру при использовании колоночной хроматографии, ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-ДМД, масс-спектрометрии, спектроскопии ЯМР, ИК-спектрометрии; подвергают стандартизации и при необходимости рекомендуют в качестве фармакопейных образцов; подвергают исследованию фармакологической активности.

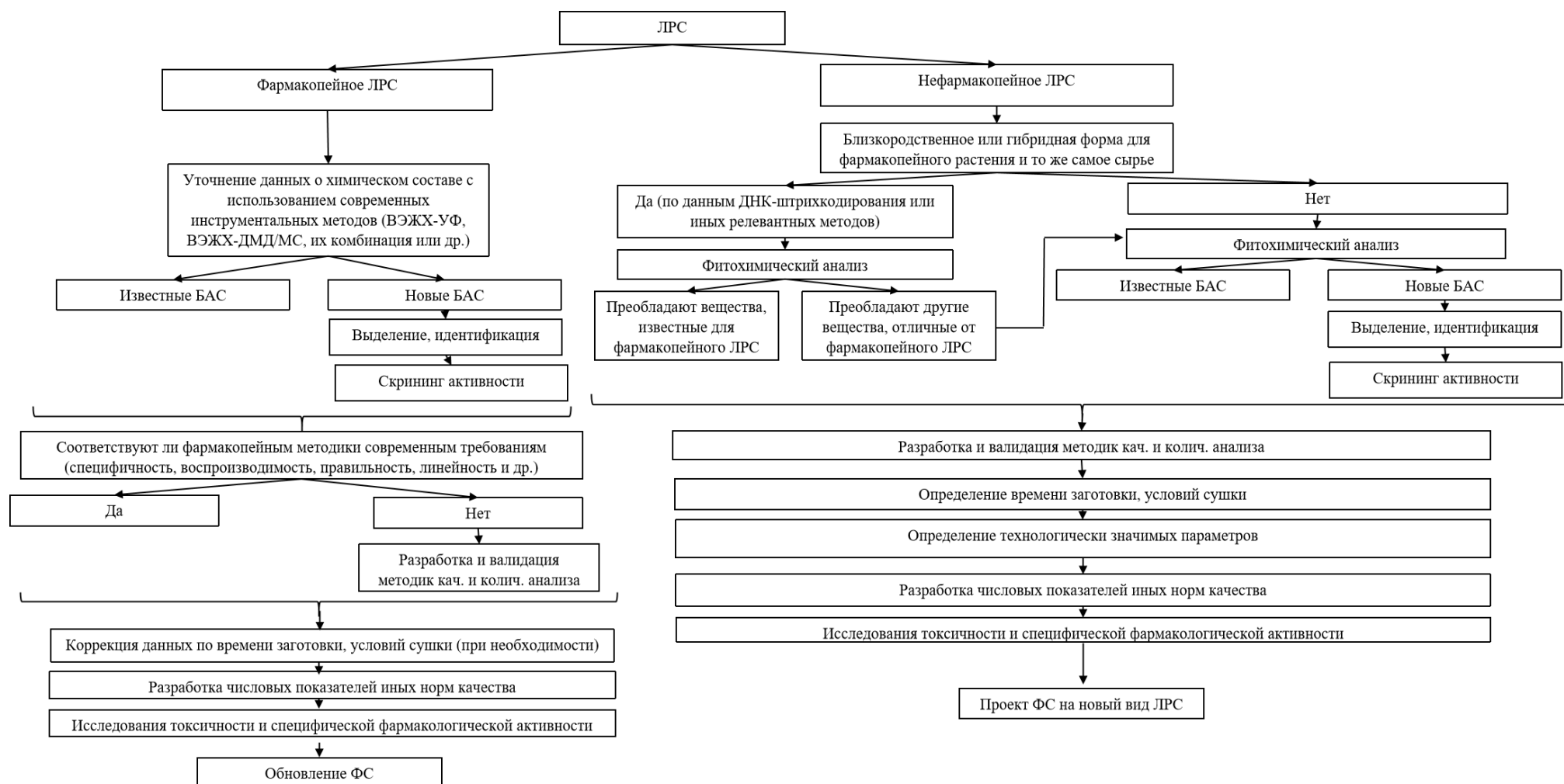


Рисунок 16 – Алгоритм выбора критериев определения подлинности и установления качества ЛРС, нормируемых преимущественно по содержанию фенольных соединений

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных экспериментальных данных разработан методологический подход к исследованию лекарственного растительного сырья, содержащего в качестве ведущей группы БАС фенольные соединения. Представленный алгоритм позволяет рационально и обоснованно подходить к выбору критериев определения подлинности ЛРС с использованием современных методов установления совокупности диагностических признаков.

На этапе детального фитохимического исследования использование сепарационных методов анализа (ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-ДМД) в сочетании с передовыми методами позволит выделять химические вещества и устанавливать структуру новых соединений (методом масс-спектрометрии, спектроскопии ЯМР, ИК-спектрометрии) и идентифицировать доминирующие или диагностически значимые соединения. Расшифрованный химический профиль позволит объективно подойти к выбору методов анализа на этапе определения основных групп биологических активных веществ (методом ТСХ), суммарного содержания фенолокислот, фенологликозидов, флавоноидов, фенилпропаноидов (методом СФ), а также доминирующих компонентов (методом ВЭЖХ или КЭ).

При фитохимическом исследовании установлена необходимость определения биополимеров (полисахаридов и белков), их монокомпонентов; физико-химических констант, а также элементного состава обязательных компонентов экстракционных лекарственных форм.

На этапе фармакологического скрининга рекомендуется учитывать количественный и качественный состав ведущей группы БАС, биополимеров, макро- и микроэлементов, что позволит рационально и обоснованно подходить к определению видов биологической активности планируемых лекарственных форм.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Критический анализ литературных данных показал, что сведения о химическом составе и фармакологической активности изучаемых объектов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. имеют фрагментарный и в ряде случаев противоречивый характер. В связи с этим была выявлена необходимость совершенствования НД на официальные виды сырья и разработки проектов ФС на растительные источники, не вошедшие в ГФ РФ. Кроме того, зафиксировано, что при совместном произрастании видов одного рода они образуют гибридные формы и, как следствие, это приводит к изменению химического профиля и фармакологической активности. Данный факт свидетельствует о необходимости использования современных методов анализа для объективного определения подлинности ЛРС.

2. В результате анатомо-морфологического изучения объектов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. с использованием современных методов анализа были установлены диагностические признаки их сырья, заключающиеся в комплексе диагностических признаков: для родов *Arctostaphylos* Adans., и *Vaccinium* L. *Prunella* L. по наличию и характеру люминисценции на листовой пластинке трихом, млечников, сети жилок, черешка и кутикулы, а также анатомо-диагностических признаков дополнительно черешка листа для всех исследуемых видов ЛРС, для клюквы болотной – побегов и плодов и для видов черноголовки – стеблей, цветков и семян. Также для внесения в проект ФС в раздел «Определение основных групп биологически активных веществ» были разработаны методики ТСХ, в основе которых лежит использование в качестве СО диагностических и доминирующих компонентов. Данные, полученные в результате использования молекулярно-генетических исследований, позволили провести штрихкодирование исследуемых образцов. Полученный комплекс результатов с помощью вышеперечисленных методов позволяет объективно определять подлинность исследуемых объектов.

3. Впервые предложена схема выделения фенольного комплекса из листьев и побегов *Vaccinium vitis-idaea* L., а также из травы *Prunella vulgaris* L., *Prunella grandiflora* L. и *Prunella laciniata* L. Для видов родов *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. установлен фенольный состав и его доминирующие компоненты:

➤ Для видов рода *Arctostaphylos* Adans. из 37 соединений в сумме фенологликозидов преобладающими были арбутин и гиперозид - в сумме флавоноидов; 1,4,6-три-О-галлоил глюкоза - в сумме галлотанинов. Флавоноиды рода *Arctostaphylos* Adans. представлены монозидами кверцетина. Фенольный профиль листьев толокнянки кавказской был изучен впервые. В результате сравнительного фитохимического анализа двух видов рода *Arctostaphylos* Adans. выявлена их общность по содержанию БАВ.

➤ В сырье видов рода *Vaccinium* L. доминировали хлорогеновая кислота в сумме фенолоксилов (исключение составили брусники обыкновенной листья в сумме фенологликозидов компонент арбутин), гиперозид - в сумме флавоноидов (исключение *Vaccinium oxycoccus* L. в сумме флавоноидов основной компонент рутин и *Vaccinium uliginosum* L. – компонент изокверцитрин). Флавоноиды рода *Vaccinium* L. представлены монозидами, агликоном которых является кверцетин (исключение – *Vaccinium uliginosum* L., монозиды которой имеют агликон кверцетина и кемпферола). Из листьев *Vaccinium vitis-idaea* L. выделено и идентифицировано 27 соединений, для 3 из которых установлена структура, так как они являются новыми – 2',6'-ди-О-кофеил-арбутин (вакцинизид А), кверцетин-3-О-{2''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-α-L-рамнопиранозид (вакцинизид В) и кверцетин-3-О-{2''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)-4''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-α-L-рамнопиранозид. Из побегов *Vaccinium vitis-idaea* L. выделено и идентифицировано 17 соединений, для 3 из которых установлена структура, так как они являются новыми: катехин-О-гликозидами, - (-)-эпикатехин-3-О-α-L-рамнопиранозид (вакцинизид D), (+)-катехин-3-О-{4''-О-(3'''-гидрокси-3'''-метилглутароил)}-α-L-рамнопиранозид (вакцинизид Е) и (+)-катехин-3-О-(2'',4''-ди-О-галлоил)-α-L-рамнопиранозид (вакцинизид F).

➤ для видов рода *Prunella* L. из 18 выделенных и идентифицированных соединений основной является розмариновая кислота в сумме фенолоксилов, в сумме флавоноидов - кверцетин-3-О-(6''-рамнозил)-глюкозид и кверцетин-3-О-(6''-{3-гидрокси-3-метилглутароил})-глюкозид. Флавоноиды рода *Prunella* L. представлены биозидами кверцетина. Из травы *Prunella grandiflora* L. выделено новое соединение и установлена его структура - кверцетин-3-О-(4''-ксилозил-6''-рамнозил)-глюкозид.

Фенольные соединения из сырья видов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L., заготовленного на территории Северного Кавказа, были исследованы впервые.

4. Впервые предложена схема выделения полисахаридного комплекса для некоторых образцов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. Исследован полисахаридный комплекс (ВРПС, ПВ) некоторых видов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. В сырье видов рода *Arctostaphylos* Adans. основным компонентом ВРПС и ПВ является арабиноза; для видов рода *Vaccinium* L. в ВРПС преобладает арабиноза (исключение – *Vaccinium arctostaphylos* L., в которой преобладает галактоза), в ПВ – галактуроновая кислота (исключение – *Vaccinium myrtillus* L., преобладает арабиноза); для видов рода *Prunella* L. в ВРПС преобладает галактоза, в ПВ – галактуроновая кислота. Для всех выделенных полисахаридов впервые установлены физико-химические показатели: средняя молекулярная масса, поверхностная активность, изоэлектрическая точка, коэффициент распределения и для ПВ сорбционная способность. Полисахаридный комплекс сырья видов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L., заготовленного на территории Северного Кавказа, был исследован впервые.

5. Определено содержание белка и его компонентного состава - аминокислот, а также наличие и количество минеральных веществ некоторых видов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. Во всех исследуемых образцах основными по содержанию аминокислотами являются глутаминовая и аспарагиновая кислоты, среди элементов - кальций и калий. Содержание белка, аминокислот и элементов в сырье видов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L., заготовленного на территории Северного Кавказа, было исследовано впервые.

6. Впервые научно обосновано на примере некоторых образцов рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. возможность использования метода капиллярного электрофореза для анализа сырья, содержащего хлорогеновую и розмариновую кислоту, а также флавоноида – гиперозида. Исходя из полученных фитохимических исследований, разработаны и валидированы методики количественного определения: суммы фенологликозидов методом

спектрофотометрии (взамен титриметрического определения арбутина в ГФ СССР XI издания) для *Arctostaphylos uvae-ursi folia* и *Vaccinii vitis-idaeae folia*, а также методом капиллярного электрофореза основного компонента – арбутина; суммы фенолокислот методом спектроскопии для *Vaccinii folia*, *Vaccinii uliginosi folia* и *Prunellae herba*, а также методом капиллярного электрофореза основного компонента – хлорогеновой кислоты для рода *Vaccinium* L. (в том числе для *Vaccinii oxycocci cormus*) и розмариновой кислоты как доминирующего компонента для рода *Prunella* L.

7. В соответствии с требованиями ГФ 14 изд. для всех исследуемых образцов были установлены показатели качества, которые рекомендованы для внесения в ФС и проекты ФС в раздел «Испытания» такие, как влажность, зола общая, зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, содержание экстрактивных веществ, измельченность сырья и посторонние примеси. Также были определены режимы сушки и установлены сроки годности видов сырья.

8. Методики определения суммы флавоноидов были разработаны и валидированы для всех образцов. Они вошли в ФС ГФ РФ XIV издания (*Arctostaphylos uvae-ursi folia* ФС.2.5.0099.18; *Vaccinii vitis-idaeae folia* ФС.2.5.0063.18), а также впервые были разработаны и валидированы методики количественного определения для нефармакопейных видов сырья, которые вошли в проекты ФС впервые (*Vaccinii folia*, *Vaccinii uliginosi, folia Vaccinii oxycocci cormus* и *Prunellae herba*).

9. Экспериментально было доказано, что все сухие экстракты, полученные из сырья представителей рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L., *Prunella* L., проявляли низкотоксичные свойства (V класс токсичности). Экстракты, полученные путем экстракции спиртом этиловым 70% и 40%, обладали выраженной антиоксидантной активностью, оказывали нейропротекторное действие, а также способствовали повышению физической работоспособности животных в условиях истощающих физических нагрузок. Сухие экстракты, полученные путем экстракции водой, обладали мягким диуретическим действием, сопровождаемым относительной стабильностью электролитного состава сыворотки крови. Данный факт дает возможность предполагать калийсберегающий характер действия изучаемых водных извлечений. В результате фармакологических исследований полученных сухих экстрактов из сырья представителей рода *Arctostaphylos* Adans., *Vaccinium* L. и *Prunella* L. предполагается поливалентный профиль активности анализируемых объектов, зависящий, прежде всего, от выбора экстрагента и, соответственно, извлекаемой группы веществ.

10. На основании результатов, полученных при выполнении комплексного исследования, предложен методологический подход (в виде алгоритма) к стандартизации ЛРС, содержащего в качестве основной группы БАС фенольные соединения. В основе методологии лежит научное обоснование критериев подлинности и качества ЛРС, а также сочетание современных методов исследования, используемых в фармацевтическом анализе, которые позволяют определить химический и спектральный профиль исследуемых видов сырья.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Предложен методологический подход, включающий в себя ряд методов и методик, позволяющих избежать ошибки при заготовке и установлении подлинности производящего растения и его сырья, а также рационально, и обосновано подходить к выбору критериев методов качественного и количественного анализа при разработке стандартизации ЛРС, содержащего фенольные соединения. Методология, представленная в виде алгоритма, позволяет определять подлинность как близкородственных, так и гибридных форм растений с возможностью привлечения в качестве дополнительного метода ДНК-штрихкодирование. Результаты фитохимического исследования, определения основного состава и установления доминирующего компонента в смеси фенольных соединений позволяют совершенствовать существующие фармакопейные методики, а также разрабатывать новые методики для впервые введенных проектов ФС на новый вид сырья. При этом в одной пробоподготовке определять методом ТСХ фармакопейный показатель «Определение основных групп биологически активных веществ», «Количественное определение» по сумме веществ (УФ спектроскопия) и доминирующему

компоненту с привлечением сепарационного метода анализа (ВЭЖХ и КЭ). Результаты научных исследований, направленных на изучение и определение химической структуры отдельных веществ, являются ключевыми основами для формирования методологии их получения. Это, в свою очередь, открывает эффективные перспективы для фармакологических исследований и расширения ассортимента отечественных стандартных образцов. Продемонстрирован поливалентный профиль активности ЛРС, зависящий, прежде всего, от выбора экстрагента и, соответственно, извлекаемой группы веществ. Учтено наличие в суммарном извлечении содержание других БАС – биополимеров и макро- и микроэлементов, что позволяет не только прогнозировать фармакологические виды активности, но и впоследствии рационально подходить к разработке лекарственной формы.

Один из перспективных аспектов представленного методологического подхода, описанного в данном диссертационном исследовании, заключается в установлении критериев и разработке алгоритмов выбора методов для определения подлинности, установления химического профиля и оценки качества ЛРС, а также для прогнозирования фармакологической активности полученных извлечений на основе расшифрованного химического профиля, используя модель, описанную в аналитических алгоритмах.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. **Шамилов, А.А.** Поиск источников розмариновой кислоты во флоре Северного Кавказа / А.А. Шамилов, Н.В. Попова, М.Н. Ивашев // **Современные проблемы науки и образования.** – 2014. – № 4.; URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=14138> (дата обращения: 24.03.2024).
2. **Шамилов, А.А.** Полисахаридный состав травы черноголовки разрезной (*Prunella laciniata* L.), произрастающей на Северном Кавказе / Шамилов А.А. // **Современные проблемы науки и образования.** – 2015. – № 2-2.; URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=22809> (дата обращения: 24.03.2024).
3. **Шамилов, А.А.** Аминокислотный и минеральный состав травы черноголовки крупноцветковой (*Prunella grandiflora* L.), произрастающей на Северном Кавказе / А.А. Шамилов // **Современные проблемы науки и образования.** – 2015. – № 6. – С. 574-574.
4. **Шамилов, А.А.** Растения рода *Prunella*: химический состав, виды фармакологического действия / А.А. Шамилов // **Вестник Воронежского государственного университета. Серия: Химия. Биология. Фармация.** – 2017. – № 4. – С. 152-160.
5. **Шамилов, А.А.** Анализ полисахаридного, аминокислотного и элементного состава травы черноголовки обыкновенной (*Prunella vulgaris* L.), произрастающей на Северном Кавказе / А.А. Шамилов // **Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация.** – 2018. – № 3. – С. 271-277.
6. Диуретическая активность представителей рода *Prunella* (Lamiaceae) / **А.А. Шамилов** [и др.] // **Вестник Смоленской государственной медицинской академии.** – 2020. – Т. 19, № 3. – С. 201-207.
7. Антиоксидантная активность извлечений из травы некоторых представителей рода черноголовка (*Prunella* L.): *in vitro* и *in vivo* исследование / **А.А. Шамилов** [и др.] // **Традиционная медицина.** – 2020. – № 2 (61). – С. 40-46.
8. Некоторые аспекты церебропротективного действия извлечений из травы представителей рода черноголовка / **А.А. Шамилов** [и др.] // **Фармация.** – 2020. – Т. 69, № 5. – С. 51-56.
9. **Шамилов, А.А.** Анализ аминокислотного и элементного состава травы черноголовки разрезной (*Prunella laciniata* L.), произрастающей на Северном Кавказе / А.А. Шамилов, В.Н. Бубенчикова, Е.Р. Гарсия // **Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация.** – 2021. – № 2. – С. 114-119.
10. Разработка и валидация методики количественного определения арбутина в брусники обыкновенной листьях / **А.А. Шамилов** [и др.] // **Вопросы обеспечения качества лекарственных средств.** – 2021. – № 1 (31). – С. 4-15.
11. Разработка и валидация методики количественного определения фенольных соединений и хлорогеновой кислоты в голубики болотной листьях / **А.А. Шамилов** [и др.] // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2022. – Т. 25, № 2. – С. 14-23.

12. Разработка методики определения подлинности голубики болотной листьев методом тонкослойной хроматографии / **А.А. Шамилов** [и др.] // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2022. – № 11. – С. 10-15.
13. Внешние и микроскопические признаки травы черноголовки обыкновенной / **А.А. Шамилов** [и др.] // **Фармация.** – 2023. – Т. 72, № 4. – С. 30-36.
14. Сравнительная характеристика физико-химических свойств полисахаридов, выделенных из видов рода черноголовка / **А.А. Шамилов** [и др.] // **Химия растительного сырья.** – 2023. – № 4. – С. 89-98.
15. *Vaccinium vitis-idaea* L.: chemical contents, pharmacological activities / **A.A. Shamilov** [et al.] // **Pharmaceutical Sciences.** – 2020. – Vol. 26, № 4. – P. 344-362.
16. Bearberry (*Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Spreng.): chemical content and pharmacological activity / **A.A. Shamilov** [et al.] // **Journal of Excipients and Food Chemicals.** – 2021. – Vol. 12, № 3. – P. 49-66.
17. Caucasian Blueberry: Comparative Study of Phenolic Compounds and Neuroprotective and Antioxidant Potential of *Vaccinium myrtillus* and *Vaccinium arctostaphylos* Leaves / **A.A. Shamilov** [et al.] // **Life.** – 2022. – Vol. 12, № 12. – 15 p.
18. Investigation of phenolic compounds at the leaves and shoots *Arctostaphylos* spp. and their antioxidant and antityrosinase activities / **A.A. Shamilov** [et al.] // **Natural Product Research.** – 2022. – Vol. 36, № 24. – P. 6312-6317.
19. Olennikov, D.N. Catechin-O-Rhamnosides from *Vaccinium vitis-idaea* Stems / D.N. Olennikov, **A.A. Shamilov** // **Chemistry of Natural Compounds.** – 2022. – Vol. 58, №2. – P. 269-273.
20. Olennikov, D.N. New compounds from *Vaccinium vitis-idaea* / D.N. Olennikov, **A.A. Shamilov** // **Chemistry of Natural Compounds.** – 2022. – Vol. 58, №2. – P. 240-244.
21. Olennikov, D.N. New Glycoside of Quercetin from the Genus *Prunella* / D.N. Olennikov, **A.A. Shamilov**, N.I. Kashchenko // **Chemistry of Natural Compounds.** – 2023. – Vol. 59. – P. 647-650.

Авторские свидетельства, патенты, дипломы

1. Патент на изобретение №20222110045 от 14.04.2022 г «Биологически активная добавка, обладающая актопротекторной активностью». / В.Н. Бубенчикова, А.А. Шамилов, Д.И. Поздняков, Е.Р. Гарсия [Электронный ресурс]: Роспатент. – Режим доступа: <https://searchplatform.rospatent.gov.ru/media/National/RU/C1/2023/04/24/0002794752//0002794752.pdf>