

На правах рукописи

КАЗАКОВА МАРИЯ АЛЕКСАНДРОВНА

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
НЕКОТОРЫХ ВИДОВ И СОРТОВ РОДА МЯТА (*MENTHA L.*)**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Самара – 2025

Диссертационная работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор **Куркин Владимир Александрович**

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.

Зилфикаров Ифрат Назимович – доктор фармацевтических наук, профессор РАН, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», отдел химии природных соединений, главный научный сотрудник.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Пермь.

Защита состоится «_____» _____ 2025 г. в _____ 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 по адресу: 443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке по адресу: 443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171 и на сайте (<http://www.samsmu.ru/scientists/science/referats/2025/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «_____» _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

кандидат фармацевтических наук, доцент

Жданова Алина Валитовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Одним из ключевых направлений для отечественной фармацевтической науки и промышленности является создание в стране высокоэффективных и безопасных фармацевтических препаратов и активных субстанций представляет собой одно из ключевых направлений.

В Государственном реестре лекарственных средств приводятся данные о более 4000 наименований лекарственных препаратов растительного происхождения в Российской Федерации. Ассортимент лекарственных растительных препаратов продолжает расширяться благодаря таким преимуществам в лечении хронических заболеваний относительно синтетических лекарственных препаратов, как возможность длительного применения и комплексное воздействие на весь организм пациента.

Ведущие ученые страны изучают множество перспективных растений и соединений растительного происхождения (Авдеева Е.В., 2023; Киселева Т.Л., 2024; Кудашкина Н.В., 2024; Куркин В.А., 2024; Мизина П.Г., 2024; Правдивцева О.Е., 2024; Самылина И.А., 2024; Шмыгарева А.А., 2023; Зилфикаров И.Н., 2022; Белоногова В.Д., 2022). Род Мята (*Mentha* L.) широко используется в различных областях деятельности человека, таких как официальная и традиционная медицина, косметология, пищевая промышленность, сельское хозяйство. Однако, несмотря на популярность представителей рода *Mentha* L., единственным видом лекарственного растительного сырья (ЛРС), включенным в фармакопеи разных стран, являются листья мяты перечной (*Menthae piperitae folia*) (Государственная..., 2015, 2018, 2024; European..., 2024).

В разделе «Подлинность» ФС.2.5.0029.15 «Мяты перечной листья» ГФ РФ XIV издания при описании методики определения основных групп биологически активных веществ методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) наряду с ментолом используется раствор стандартного образца (СО) тимола, однако данное биологически активное вещество (БАВ) не является диагностически значимым компонентом данного сырья.

Кроме того, в разделе «Количественное определение» наряду с эфирным маслом методом дифференциальной спектрофотометрии определяют сумму флавоноидов в пересчете на лютеолин, однако используемая методика не лишена недостатков. На наш взгляд, с точки зрения стандартизации больший интерес представляют фенилпропаноиды, в частности, розмариновая кислота, являющаяся доминирующим компонентом фенольной природы в листьях мяты перечной. В этом отношении актуальным является внедрение в фармакопейный анализ листьев мяты перечной использование метода высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Важным также является внедрение петиолярной микроскопии в подраздел «Микроскопические признаки» раздела «Подлинность», в том числе с использованием метода люминесцентной микроскопии листа и черешка листьев мяты перечной.

В разделе ФС.2.5.0029.15 «Определение основных групп биологически активных веществ» при проведении тонкослойной хроматографии наряду с раствором ментола, целесообразно использовать раствор стандартного образца доминирующего компонента - розмариновой кислоты.

Степень разработанности темы. Несмотря на глубокую степень изученности химического листьев мяты перечной (*Mentha piperita* L.), проблема стандартизации данного вида фармакопейного растительного сырья остается актуальной.

В разделе ФС.2.5.0029.15 «Количественное определение» для подтверждения качества сырья используется количественное определение эфирного масла, основным компонентом которого является ментол (Государственная..., 2018).

Также в разделе «Количественное определение» ФС.2.5.0029.15 для количественного определения суммы флавоноидов используется метод дифференциальной спектрофотометрии при этом измерение проводят при аналитической длине волны 400 нм в пересчете на лютеолин (Государственная..., 2018). Однако данная методика имеет ряд недостатков. Основываясь на проведенных исследованиях и данных обзора литературы, доминирующим соединением фенольной природы является розмариновая кислота (Куркин В.А., 2024; Gudzenko A., 2013; European..., 2024). Из этого следует, что при количественном определении целесообразнее проводить определение суммы фенилпропаноидов и количественное определение розмариновой кислоты методом ВЭЖХ.

По нашему мнению, определение тимола в разделе «Определение основных групп биологически активных веществ» нецелесообразно, так как тимол не является диагностически значимым соединением в химическом составе листьев мяты перечной.

В соответствии с ГФ РФ XIV издания основными микроскопическими признаками листьев мяты перечной являются строение стенок клеток эпидермиса, тип строения устьичных аппаратов и их расположение, наличие простых клеточных волосков, головчатых волоски и эфиромасличных желез (Государственная..., 2018). На наш взгляд, использование новых методов микроскопии, таких как люминесцентная микроскопия черешка и листьев мяты перечной, позволит выделить новые диагностические микроскопические признаки сырья, что в перспективе будет способствовать более объективному анализу сырья.

Цель работы и основные задачи исследования - совершенствование методик стандартизации листьев мяты перечной и проведение сравнительного фармакогностического исследования сортовых форм и некоторых видов рода Мята (*Mentha* L.).

Задачи исследования:

1. Анатомо-гистологическое исследование листа мяты перечной (*Mentha piperita* L.).
2. Сравнительное фитохимическое исследование листьев сортовых форм и некоторых видов рода Мята (*Mentha* L.) с применением современных методов исследования (ТСХ, спектрофотометрии и ВЭЖХ).
3. Препаративное выделение и идентификация индивидуальных веществ из листьев мяты перечной с помощью таких современных методов, как спектрофотометрия, ВЭЖХ, ЯМР-спектроскопия и масс-спектрометрия.
4. Разработка методики качественного анализа листьев мяты перечной с использованием метода ТСХ и спектрофотометрии.
5. Разработка методики количественного определения суммы фенилпропаноидов в ЛРС «Мяты перечной листья».
6. Разработка методики количественного определения листьев мяты перечной с помощью метода ВЭЖХ.
7. Изучение антидепрессантной, диуретической и антимикробной активности сухого экстракта листьев некоторых видов и сортов мяты, а также индивидуальных веществ (ментол, лютеолин, 5,3'-дигидрокси-4,7,8,4'-тетраметоксифлавонон).

8. Разработка проекта дополнений к фармакопейной статье (ФС) на ЛРС «Мята перечной листья».

Научная новизна. В ходе работы проведен анализ петиолярной анатомии листа мяты перечной с применением методов световой и люминесцентной микроскопии (*Mentha piperita* L.) и определены особенности строения и люминесценции частей черешка, заключающиеся в следующем:

- особой ланцетной форме черешка с изломом посередине к верхней стороне листа;
- люминесценции протопластов железистых трихом, указывающей на наличие в секрете под кутикулой монотерпенов (ментола) и флавоноидов;
- всеорвидных образованиях, имеющих характерную для флавоноидов желто-оранжевую люминесценцию в диапазоне возбуждения 330-400 нм и локализованных во флоэмной части проводящей системы;
- ярко-голубой люминесценции в диапазоне возбуждения 330-400 нм в клетках мезофилла черешка указывающая на наличие фенилпропаноидов (в частности, розмариновой кислоты).

В ходе спектрофотометрического исследования установлено, что соединениями, определяющими максимумы поглощения УФ-спектра извлечения из листьев мяты перечной, являются гидроксикоричные кислоты. Нами изучены спектральные характеристики стандартных образцов, таких как хлорогеновая кислота, сальвианоловая кислота В, кофейная кислота и розмариновая кислота. Определено, что доминирующим компонентом фенольной природы является розмариновая кислота, что позволило сделать вывод о целесообразности разработки методики количественного определения розмариновой кислоты в листьях мяты перечной методом ВЭЖХ.

В результате эксперимента нами были определены условия, оптимальные для экстрагирования – размер частиц сухого сырья, проходящего через сито 2 мм, время экстрагирования – 60 минут, в качестве экстрагента выбран спирт этиловый 60%, в соотношении «сырье:экстрагент» – 1:50. Научно обоснована целесообразность проведения стандартизации листьев мяты перечной по содержанию суммы фенилпропаноидов в пересчете на розмариновую кислоту.

В диссертационной работе нами обоснована также целесообразность стандартизации листьев мяты перечной по содержанию доминирующего фенилпропаноида – розмариновой кислоты методом ВЭЖХ.

С использованием колоночной хроматографии извлечений из листьев мяты перечной нами выделены 7 индивидуальных соединений, из них фенилпропаноиды (розмариновая кислота и кофейная кислота), флавоноиды (5,3'-дигидрокси-4,7,8,4'-тетраметоксифлавоны, 5,4'-дигидрокси-6,7,3'-триметоксифлавоны, лютеолин и цинарозид) и углевод (сахароза), идентифицированные на основе данных УФ-, ¹H-ЯМР, ¹³C-ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, а также результатов кислотного и ферментативного гидролиза. Соединение 5,4'-дигидрокси-6,7,3'-триметоксифлавоны впервые описано в качестве компонента листьев мяты перечной (*Mentha piperita* L.). Флавоноид 5,3'-дигидрокси-6,7,8,4'-тетраметоксифлавоны впервые выделен в России из листьев мяты перечной (*Mentha piperita* L.).

В ходе проведения исследования микробиологической активности водно-спиртовых извлечений листьев мяты перечной определено, что экстракты исследуемых образцов сырья проявляют антибактериальную активность в отношении штаммов *P. aeruginosa*, *P. aeruginosa*, *B. cenocepacia*, условно-патогенных микроорганизмов, таких как *S. maltophilia*, *C. indologenes*, *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli*, *C. albicans*. Исследование противомикробной активности извлечений из листьев мяты перечной в отношении *Pseudomonas aeruginosa* штамм 1, *Pseudomonas aeruginosa* штамм 2, *Burkholderia cenocepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Chryseobacterium indologenes* проведено впервые.

Исследование сухих экстрактов из листьев некоторых видов и сортов мяты с помощью теста Порсолта показало, что сухой экстракт мяты длиннолистной увеличивает двигательную активность на 154%, проявляет выраженное антидепрессантное действие, тогда как сухой экстракт листьев мяты перечной и 5,3'-дигидрокси-4,7,8,4'-тетраметоксифлавоны снижают двигательную активность животных на 73%, проявляя седативный эффект.

При исследовании диуретической активности было выявлено, что сухой экстракт мяты перечной вызывает достоверное увеличение натрийуреза (на 55%) за 24 часа опыта относительно показателей контроля, а сухой экстракт мяты перечной сорт «Шоколадная» вызывает достоверное значительное увеличение натрийуреза (на 189%) за 4 ч опыта и достоверное значительное увеличение натрийуреза (на 78%) и калийуреза (на 108%) за 24 ч опыта относительно показателей контроля. Сухой экстракт мяты длиннолистной (10 мг/кг) достоверно увеличивает натрийурез (на 46%), калийурез (на 84%) и креатининурез (на 30%) за 24 ч опыта относительно показателей контроля. Сухой экстракт мяты перечной (10 мг/кг) вызывает изолированное достоверное увеличение натрийуреза (на 82%) относительно показателей контроля. Данные могут быть полезны при разработке калий- и натрий-сберегающих препаратов, а также диуретических, седативных и антидепрессантных средств.

Теоретическая и практическая значимость. На основании проведенного анатомо-гистологического анализа были получены следующие результаты:

1. Черешки мяты перечной могут играть диагностическую роль при отличии листьев данного растения от близкородственных видов, произрастающих в средней полосе России.
2. Наиболее ярким диагностическим признаком является очертание поперечного сечения черешка, имеющего ланцетную форму с изломом по середине к верхней стороне листа. Излом образует тупой угол, достигающий 140°.
3. Трихомы на поверхности черешка аналогичны описанным ранее в литературе на листовой пластинке. Люминесценция протопластов железистых трихом указывает на наличие в секрете под кутикулой монотерпенов (ментола) и флавоноидов.
4. Основная концентрация флавоноидов, вероятнее всего, локализована во флоэмной части проводящей системы в виде кристаллических веерообразных образований, имеющих характерную для флавоноидов желто-оранжевую люминесценцию в диапазоне возбуждения 330-400 нм.
5. Фенилпропаноиды (розмариновая кислота) локализованы в клетках мезофилла черешка и могут быть обнаружены по ярко-голубой люминесценции в диапазоне возбуждения 330-400 нм.

Полученные данные о строении черешка листа мяты перечной, включенные в раздел «Микроскопические признаки» проекта дополнений к ФС «Мяты перечной листья», позволят повысить уровень стандартизации лекарственного растительного сырья мяты перечной.

В ходе колоночной хроматографии были выделены 7 индивидуальных соединений, такие как розмариновая кислота, кофейная кислота, 5,4'-дигидрокси-6,7,3'-триметоксифлавоны, 5,3'-дигидрокси-6,7,8,4'-тетраметоксифлавоны, лютеолин, цинарозид и сахара. Данные вещества были использованы при разработке методики количественного определения суммы фенилпропаноидов в листьях мяты перечной. Для разработки данной методики применяли метод прямой спектрофотометрии. Валидационная оценка методики проводилась в соответствии с ОФС 1.1.0012 «Валидация аналитических методик» по показателям: специфичность, линейность, правильность.

Разработана методика количественного определения розмариновой кислоты в листьях мяты перечной методом ВЭЖХ с использованием выделенных индивидуальных соединений. Подобраны условия хроматографирования и проведена оценка пригодности методики. Выполнено скрининговое исследование водно-спиртовых извлечений с целью определения пригодности методики для подтверждения подлинности сырья сортовых форм мяты перечной и других видов рода *Mentha* L.

Разработана методика определения подлинности листьев мяты перечной (*Mentha piperita* L.) методом ТСХ, заключающаяся в обнаружении розмариновой кислоты наряду с ментолом в водно-спиртовых извлечениях мяты перечной, а также способ идентификации сырья с использованием спектрофотометрии.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о целесообразности стандартизации листьев мяты перечной (*Mentha piperita* L.) путем определения содержания доминирующего и диагностически значимого фенилпропаноида – розмариновой кислоты с использованием современных методов ТСХ, УФ-спектрофотометрии, ВЭЖХ с детектированием на УФ-детекторе при $\lambda=330$ нм.

Скрининговое исследование компонентного состава листьев сортовых форм мяты перечной, а также мяты длиннолистной и мяты круглолистной свидетельствует о высоком содержании в них суммы фенилпропаноидов.

Результаты исследования биологической активности водно-спиртовых извлечений и сухих экстрактов из листьев мяты позволили сделать вывод о перспективности использования сырья сортовых форм мяты перечной и других видов мяты для разработки антимикробных, калий- и натрий-сберегающих препаратов, а также диуретических, седативных и антидепрессантных лекарственных растительных средств. Так, при изучении микробиологической активности наиболее сильный бактерицидный и бактериостатический эффект показали образцы водно-спиртовых извлечений мяты перечной сорт «Ментоловая» и мяты круглолистной сорт «Ананасная». Сухие экстракты мяты длиннолистной и мяты перечной сорт «Шоколадная» показали значительную диуретическую и в случае сухого экстракта мяты длиннолистной антидепрессантную активность. Сухой экстракт листьев мяты перечной и 5,3'-дигидрокси-4,7,8,4'-тетраметоксифлавоны показали снижение двигательной активности животных на 73%, проявляя седативный эффект.

Разработан проект дополнений к ФС «Мяты перечной листья» для включения в Государственную фармакопею Российской Федерации.

Внедрение результатов исследования. Результаты диссертационного исследования внедрены в учебно-образовательные и научно-исследовательские процессы подразделений

Института фармации Самарского государственного медицинского университета (г. Самара) и кафедры фармакогнозии Пермской государственной фармацевтической академии (г. Пермь). Соответствующие акты приведены в приложениях № 2 диссертационной работы.

Личный вклад автора. В диссертационной работе представлены результаты исследований, которые были получены автором лично. В результате анатомо-гистологического исследования видов рода *Mentha* L. были выявлены диагностически значимые признаки листьев *Mentha piperita* L. При проведении фитохимического исследования листьев мяты перечной (*Mentha piperita* L.) и изучения их компонентного состава, из данного вида сырья автором были выделены и идентифицированы 7 индивидуальных веществ.

Методики качественного и количественного анализов извлечений из листьев мяты перечной, разработанные автором диссертационной работы, с применением современных методов анализа, таких как ТСХ, спектрофотометрии и ВЭЖХ позволили выявить перспективность применения сырья некоторых сортовых форм мяты перечной и других представителей рода *Mentha* L. в фармации и медицине.

Для определения перспективности использования листьев мяты перечной, как источника для создания препаратов, обладающих диуретической и нейротропной активностью, изучены сухие экстракты и извлеченный из листьев мяты перечной и индивидуальное соединение фенольной природы – 5,3'-дигидрокси-6,7,8,4'-тетраметоксифлавонол. В ходе микробиологического исследования определено, что настойки данных видов сырья проявляют антимикробную активность в отношении *P. aeruginosa* штамм 1, *P. aeruginosa* штамм 2, *B. cenocepacia*, *S. maltophilia*, *C. indologenes*, штаммов *B. cereus* (ATCC 29213) *S. aureus* (ATCC 29213), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *C. albicans* (ATCC 90028).

Автор является разработчиком проекта дополненной ФС на ЛРС «Мята перечной листья», в котором приведена новая редакция разделов «Микроскопические признаки», «Идентификация», «Количественное определение» (Приложение № 6).

Связь задач исследования с планами научно-исследовательских работ. Диссертационное исследование проводилось с учетом плана научно-исследовательских работ Самарского государственного медицинского университета, а именно в рамках выполнения темы НИОКР: «Химико-фармацевтические, биотехнологические, фармакологические и организационно-экономические исследования по разработке, анализу и применению фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов» (регистрационный номер: АААА-А19-119051490148-7, Дата регистрации: 14.05.2019 г.).

Методология и методы исследования. Методология данной диссертационной работы основана на глубоком и детальном анализе и систематизации существующих литературных данных, касающихся фармакогностических исследованиях листьев некоторых видов и сортов представителей рода *Mentha* L., оценке актуальности и степени разработанности выбранной темы исследования.

В рамках диссертационной работы была определена цель исследования, сформулированы ключевые задачи для её достижения, а также разработан план выполнения диссертационного исследования, выбраны объекты и методы исследования.

Объектами данного исследования являлись листья некоторых видов и сортов представителей рода мята (*Mentha* L.), культивируемые в разных регионах России. Сырье заготовлено в Ботаническом саду Самарского университета (г. Самара), Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Ордена Трудового Красного Знамени

Никитском ботаническом саду — Национальном научном центре РАН» (г. Ялта). Исследовались также промышленные образцы сырья (АО «Красногорсклексредства» различных серий, биологически активная добавка (БАД) мяты перечной ООО «Камелия-ЛТ»). Также в ходе диссертационного исследования были изучены водно-спиртовые извлечения из них. Исследование осуществлялось с применением современных методов, таких как цифровая и люминесцентная микроскопия, различные виды хроматографий (тонкослойная, колоночная, высокоэффективная жидкостная), УФ-спектрофотометрии, масс-спектрометрии, ЯМР-спектроскопии, а также методы фармакологических исследований.

Математическую обработку полученных данных осуществляли с применением программного обеспечения в соответствии с Государственной фармакопеей Российской Федерации XIV и XV изданий.

Степень достоверности. Достоверность настоящей диссертационной работы обусловлена значительным объемом экспериментальных данных, полученных в ходе исследования с использованием как современных, так и классических аналитических методов, а также корректной обработкой большого объема информации и опорой на актуальные и рецензируемые источники. Результаты исследования были обработаны с применением математических методов анализа данных.

Цельные листья некоторых видов и сортов представителей рода мята (*Mentha* L.) являлись объектами данного исследования. Сырье некоторых видов и сортов представителей рода мята (*Mentha* L.), культивируемых на территории Российской Федерации, было собрано на фармакопейном участке Ботанического сада Самарского Университета, а также в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки «Ордена Трудового Красного Знамени Никитском ботаническом саду — Национальном научном центре РАН» (г. Ялта). Исследовались также промышленные образцы сырья (АО «Красногорсклексредства» различных серий, биологически активная добавка (БАД) мяты перечной ООО «Камелия-ЛТ»). Также в ходе диссертационного исследования были изучены водно-спиртовые извлечения из них. Исследования проводились с применением современных методов исследования.

Обработка полученных данных проводилась с применением программного обеспечения в соответствии с действующими общими фармакопейными статьями Государственной фармакопеи Российской Федерации.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационная работа соответствует пп. 2,3,5 и 6 паспорта научной специальности 3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

Положения, выдвигаемые на защиту:

1. Результаты исследования анатомии и гистологии листьев мяты перечной (петиолярная микроскопия методом световой и люминесцентной микроскопии).
2. Данные по разработке подходов к качественному анализу листьев мяты методом тонкослойной хроматографии и спектрофотометрии.
3. Данные о результатах исследования компонентного состава листьев мяты перечной, способах препаративного выделения и идентификации индивидуальных соединений.
4. Результаты исследования по разработке методики количественного определения суммы фенилпропаноидов в водно-спиртовых экстрактах мяты перечной

(*Mentha piperita* L.) в пересчете на розмариновую кислоту и абсолютно сухое сырье методом прямой спектрофотометрии.

5. Результаты разработки методики качественного исследования состава водно-спиртовых извлечений мяты перечной (*Mentha piperita* L.) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.
6. Результаты разработки методики количественного исследования розмариновой кислоты мяты перечной (*Mentha piperita* L.) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.
7. Результаты диссертационной работы, включенные в проект дополненной фармакопейной статьи «Мяты перечной листья».

Публикации. Автор диссертационного исследования представил результаты своей работы в 18 публикациях. Среди них 5 статей опубликованы в журналах, которые включены в перечень рецензируемых научных изданий, утверждённый Высшей аттестационной комиссией, в том числе 3 статьи были размещены в журналах, входящих в международные базы данных. Получен 1 патент Российской Федерации на изобретение № 2833834 «Способ количественного определения розмариновой кислоты в листьях мяты перечной».

Апробация работы. Результаты диссертационной работы были доложены и обсуждены на симпозиумах, научных и научно-практических конференциях различных уровней (областного, всероссийского и международного), таких как XII Научно-практической конференции молодых учёных и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием, посвящённой «Году молодёжи» (Таджикистан, 2017 г.); V Научно-практическая конференция «Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине» (г. Москва, 2017 г.); X Международный симпозиум «Фенольные соединения: свойства, активность, инновации» (г. Москва, 2018 г.); III Межвузовская научно-практическая конференция с международным участием, посвященная 100-летию Самарского государственного медицинского университета «Современные проблемы фармакогнозии» (г. Самара, 2018 г.); IV Межвузовская научно-практическая конференция, посвященная 100-летию Самарского государственного медицинского университета «Фармацевтическая ботаника: современность и перспективы» (г. Самара, 2019 г.); XIV Всероссийская (88-я Итоговая) студенческая научная конференция СНО с международным участием, посвященная 90-летию Клиник СамГМУ «Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты» (г. Самара, 2020 г.); III Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы и перспективы фармацевтической науки и практики» (г. Кемерово, 2023 г.); XIV Всероссийская научная конференция с международным участием молодежного научного общества «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, 2024 г.); Международная конференция «Достижения и перспективы создания новых лекарственных средств растительного происхождения» (г. Москва, 2024 г.); Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Аспирантские чтения - 2023: Молодые ученые - медицине. Приоритетные направления науки в достижении технологического суверенитета.» SIMS - 2023: Samara International Medical Science (г. Самара, 2023 г.); III Научно-практическая онлайн-конференция с международным участием, посвященная 105-летию Самарского государственного медицинского университета «Современные проблемы фармации» (г. Самара, 2024 г.); XXV Международный съезд ФИТОФАРМ 2024 (г. Санкт-Петербург, 2024 г.).

Объем и структура работы. Диссертационная работа изложена на 174 страницах, состоит из введения, обзора литературы, главы об объектах и методах исследования, 4 глав результатов экспериментальных исследований, выводов и заключения, списка литературы и приложения. В данную работу включены 26 таблиц и 33 рисунков. Список литературы состоит из 163 источников, из которых 27 – на иностранном языке.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В диссертационной работе были исследованы листья некоторых видов и сортовых форм рода *Mentha* L., культивируемые на территории Самарской области (Ботанический сад Самарского университета), Республики Крым (Никитский ботанический сад), а также промышленные образцы фармакопейного сырья.

В рамках диссертационной работы также исследованы водно-спиртовые извлечения (40, 50, 60, 70, 80, 90 и 96 % спирт) из листьев с использованием образцов сравнения, полученных на кафедре фармакогнозии с ботаникой и основами фитотерапии ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России: розмариновая кислота, хлорогеновая кислота, кофейная кислота, сальвианоловая кислота В, цинарозид, лютеолин.

Анатомо-морфологический анализ проводился с использованием световой и люминесцентной микроскопии (Люминесцентный микроскоп марки «Альтами» ЛЮМ-2 (Россия) с увеличениями x40, x100, x400).

Исследование растительного сырья проводили с использованием химических и физико-химических методов анализа. Для установления химического состава листьев мяты перечной и других видов и сортовых форм был использован метод жидкостно-адсорбционной колоночной хроматографии; для разделения применялись силикагель марки силикагель КСК 50/100 (Россия) и полиамид (MN Polyamid SC 6, Германия). Характеристики веществ, выделенных из сырья тысячелистника обыкновенного, с целью их идентификации определяли путем регистрации ^1H -ЯМР-спектров, полученных на приборе «JNM-ECX 400» (399.78 МГц) и спектров ^{13}C -ЯМР – на приборе «JNM-ECX 400» (100.52 МГц).

Масс-спектры высокого разрешения были зарегистрированы на приборе «Bruker micrOTOF II» методом электрораспылительной ионизации (ESI). Измерения выполнены на положительных (напряжение на капилляре – 4500 V) ионах. Диапазон сканирования масс – m/z 50 – 3000, калибровка — внешняя или внутренняя (Electrospray Calibrant Solution, Fluka). Использовался шприцевой ввод вещества для растворов в метаноле, скорость потока – 3 мкл/мин. Газ-распылитель – азот (4 л/мин), температура интерфейса – 180 °С.

Для исследования извлечений изучаемых видов сырья и выделенных веществ использовали метод тонкослойной хроматографии с пластинками «Сорбфил ПТСХ-АФ-А-УФ» (Россия). Количественное определение суммы фенилпропаноидов и, в частности, проводили на спектрофотометре «Specord 40» (Analytik Jena) в кюветах с толщиной слоя 10 мм в диапазоне длин волн от 190 нм до 700 нм. ВЭЖХ-анализ методом обращено-фазовой хроматографии в изократическом режиме на высокоэффективном жидкостном хроматографе «Милихром-6» (НПАО «Научприбор») (колонок ВЭЖХ «КАХ-6-80-4», 2 мм x 80 мм; C18 5 мкм). Температура колонки поддерживалась при 30 °С. Подвижная фаза: ацетонитрил (ПФА) – 1% раствор уксусной кислоты (ПФБ), скорость элюирования – 1 мл/мин. Детекцию веществ осуществляли при длине волны 330 нм. Объем инжестируемой пробы составил 2 мкл.

Определяли диуретическое, нейротропное и антимикробное действия сухого экстракта листьев видов и сортов рода Мята (*Mentha* L.), водно-спиртовых извлечений листьев видов и сортов рода Мята (*Mentha* L.), а также выделенных из листьев мяты перечной флавоноидов и ментола.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Анатомо-гистологическое исследование листа мяты перечной (*Mentha piperita* L.)

В результате исследования были определены наиболее яркие диагностические признаки.

Очертание поперечного сечения черешка, ланцетной формы с изломом по середине к верхней стороне листа. Излом образует тупой угол в 140° . Ланцетная форма определялась по соотношению ширины и длины поперечного сечения составляющего пропорцию 1:3. Адаксиальная сторона всех срезов как в базальной, медиальной так и в апикальной части имеет округлую форму. При этом диаметр окружности сопоставим по всей длине черешка. В базальной части у поперечного сечения имеются овальные рёбра по краям среза, нарушающие общую круговую симметрию (рис. 1).

Результаты исследования люминесценции индивидуальных веществ были соотнесены с люминесценцией анатомических структур листа мяты перечной (рис. 2-5). Трихомы на поверхности черешка мяты перечной аналогичны описанным ранее в литературе на листовой пластинке. Люминесценция протопластов железистых трихом указывает на наличие в секрете под кутикулой монотерпенов (ментола) и флавоноидов. Основная концентрация флавоноидов, вероятнее всего, локализована во флоэмной части проводящей системы в виде кристаллических веерообразных образований, имеющих характерную для флавоноидов желто-оранжевую люминесценцию в диапазоне возбуждения 330-400 нм. Фенилпропаноиды (розмариновая кислота) локализованы в клетках мезофилла черешка и могут быть обнаружены по ярко-голубой люминесценции в диапазоне возбуждения 330-400 нм.

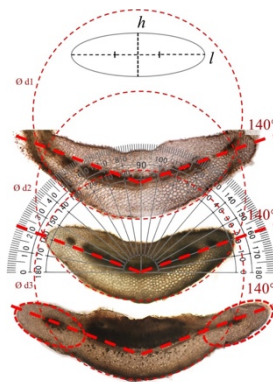


Рисунок 1 - Ланцетная форма поперечных сечений черешка.

Обозначения: $\varnothing d1$ – диаметр окружности в очертании апикального среза, $\varnothing d2$ – диаметр окружности в очертании медиального среза; $\varnothing d3$ – диаметр окружности в очертании базального среза; h – ширина поперечного сечения черешка; l – длина поперечного сечения черешка;

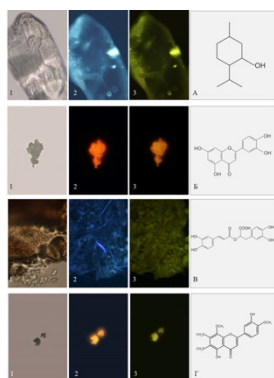


Рисунок 2 - Люминесцентный анализ веществ стандартов: А – ментол; Б – лютеолин; В – розмариновая кислота; Г – вещество, изолированное из листьев мяты перечной 5,3'-дигидрокси-6,7,8,4'-тетраметоксифлавоны.

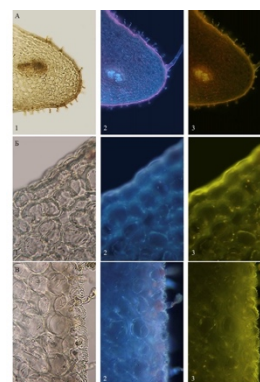


Рисунок 3 - Люминесцентный анализ эпидермальных поверхностей: А – ребро черешка (x100); Б – адаксиальная сторона черешка (x400); В – абаксиальная сторона черешка (x400)

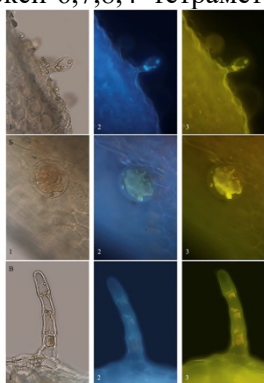


Рисунок 4 - Люминесцентный анализ трихом на поверхности черешка: А – головчатый волосок (x100); Б – грибовидная железка (x400); В – простой многоклеточный волосок (x400)

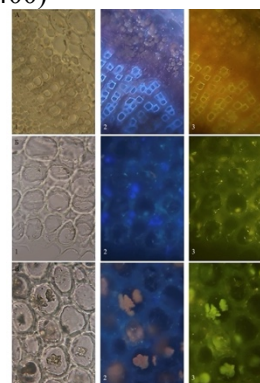


Рисунок 5 - Люминесцентный анализ протопластов и клеточных включений клеток мезофилла и проводящих тканей: А – фрагмент проводящего пучка с ксилемой и флоэмой (x100); Б – клетки мезофилла черешка с адаксиальной стороны (x400); В – клетки мезофилла черешка с абаксиальной стороны (x400)

Обозначения: 1 – видимая область света; 2 – светофильтр 420-550 нм; 3 – светофильтр 330-400 нм.

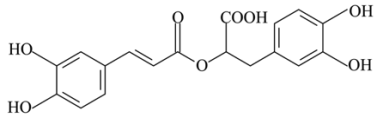
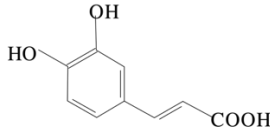
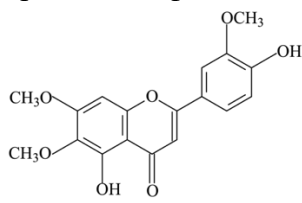
2. Исследование компонентного состава листьев мяты перечной

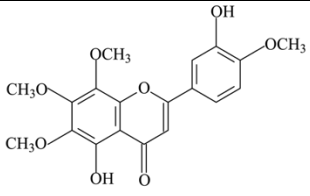
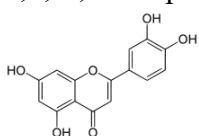
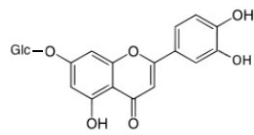
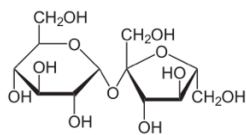
Выделение индивидуальных соединений из водно-спиртового извлечения листьев мяты перечной проводим методом колоночной хроматографии с последующей многократной рехроматографией. Для определения химической структуры выделенных веществ использовали методы ^1H -ЯМР, ^{13}C -ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии, ТСХ, а также спектрофотометрии (табл. 1)

В результате кислотного и ферментативного гидролиза цинарозида (6) получен агликон, идентифицированный как лютеолин (5,7,3',4'-тетрагидроксифлавоны) (5), который в свободном виде выделен в минорных количествах и обнаружен в листьях мяты перечной методом ВЭЖХ.

Среди сопутствующих веществ листьев мяты перечной впервые выделена сахароза (7), идентифицированная на основании ЯМР-спектров и масс-спектров.

Таблица 1 - Физико-химические характеристики индивидуальных соединений, выделенных из листьев мяты перечной

№ п/п	Название индивидуального соединения	Характеристика и химическая формула
1.	Розмариновая кислота 	$C_{18}H_{16}O_8$; аморфное вещество светло-желтого цвета; $\lambda_{\max}$ EtOH 243, 290, 328 нм. ♦ Спектр ЯМР 1H (500МГц, DMSO-d_6, δ, м.д., J/Гц): 7.43 (1H, д, J = 16.0, H-7), 7.04 (1H, д, J = 2.0, H-2), 6.96 (1H, дд, J = 2.0 и J = 9.0, H-6), 6.71 (1H, д, J = 9.0, H-5), 6.68 (1H, д, J = 2.0, H-2'), 6.64 (1H, д, J = 9.0, H-5'), 6.51 (1H, дд, J = 2.0 и J = 9.0, H-6'), 6.20 (1H, д, J = 16.0, H-8), 4.93 (1H, дд, J = 3.0 и J = 8.0, H-6), 2.98 и 2.75 (2H, м, H-7'). ♦ Спектр ЯМР ^{13}C (125.78 МГц, DMSO-d_6, δ_C, м.д.): 166.60 (C-9 и C-9'), 148.80 (C-4), 146.14 (C-4'), 145.35 (C-3), 145.09 (C-7), 144.08 (C-3'), 129.66 (C-1'), 125.2 (C-1), 121.9 (C-6), 120.21 (C-6'), 117.1 (C-2'), 116.62 (C-5), 116.28 (C-2), 115.80 (C-8), 115.46 (C-5'), 114.95 (C-5), 74.48 (C-8'), 37.30 (C-7'). ♦ Масс-спектр: HR-ESI-MS m/z 359.0770 $[M-H]^+$, 383.0736 $[M+Na]^+$.
2.	Кофейная кислота 	Светло-желтые кристаллы состава $C_9H_8O_4$ с т. пл. 218-220° (ацетон-вода). $\lambda_{\max}$ EtOH 217, 243, 299, 328 нм. ♦ Спектр 1H-ЯМР-спектр (399.78 МГц, DMSO-d_6, δ, м.д., J/Гц): 12.08 (1H, уш.с, COOH), 9.48 (1H, с, 4-OH-группа), 9.09 (1H, с, 3-OH-группа), 7.38 (1H, д, J = 16.0, H-7), 6.99 (1H, д, J = 2.0, H-2), 6.92 (1H, дд, J = 2.0 и J = 9.0, H-6), 6.72 (1H, д, J = 9.0, H-5), 6.14 (1H, д, J = 16.0, H-8). ♦ Спектр ЯМР ^{13}C (100.52 МГц, DMSO-d_6, δ_C, м.д.): 168.56, 148.74 (C-4), 146.15 (C-3), 145.23 (C-7), 126.32 (C-1), 121.79 (C-6), 116.37 (C-5), 115.72 (C-2), 115.25 (C-8).
3.	5,4'-дигидрокси-6,7,3'- триметоксифлавонон 	$C_{18}H_{16}O_7$; кристаллы желтого цвета, т.пл. 202-204 °C (хлороформ-гексан); $\lambda_{\max}$ EtOH 278, 345 нм; +NaOAc 278, 345; +NaOAc+H_3BO_3 278, 345; +NaOMe 278, 380 пл.; +$AlCl_3$ 290, 363; +$AlCl_3$+HCl 290, 363; +NaOMe 290, 400. ♦ Спектр ЯМР 1H (500 МГц, DMSO-d_6, δ, м.д., J/Гц): 12.95 (1H, с, 5-OH группы), 10.00 (1H, с, 4'-OH группы), 7.62 (1H, дд, J = 2.0 и J = 9.0, H-6'), 7.61 (1H, д, J = 2.0, H-2'), 6.97 (1H, с, H-3), 6.95 (1H, с, H-3), 6.92 (1H, д, J = 9.0, H-5'), 3.94 (3H, с, CH_3O при C-7), 3.91 (3H, с, CH_3O при C-3'), 3.75 (3H, с, CH_3O при C-6). ♦ Спектр ЯМР ^{13}C (125.78 МГц, DMSO-d_6, δ_C, м.д.): 182.74(C-4), 167.43 (C-7), 164.48 (C-5), 159.08 (C-2), 158.08 (C-4'), 153.19 (C-9), 148.50 (C-3'), 132.33 (C-6), 129.24 (C-6'), 121.88 (C-2'), 120.93 (C-1'), 119.09 (C-5'), 105.55 (C-10), 103.50 (C-3), 92.11 (C-8), 60.52 (CH_3O при C-6), 56.94 (CH_3O при C-7), 56.26 (CH_3O при C-3'). ♦ Масс-спектр: HR-ESI-MS m/z 343.0821 $[M-H]^-$, m/z 367.0788 $[M+H]^+$.
4.	5,3'-дигидрокси-6,7,8,4'- тетраметоксифлавонон	$C_{19}H_{20}O_8$; кристаллы желтого цвета, т.пл. 176-178 °C (этиловый спирт); $\lambda_{\max}$ EtOH 297, 347 нм; +NaOAc 297, 347; +NaOAc+H_3BO_3 300, 349; +NaOMe 278, 380 пл.; +$AlCl_3$ 293, 367; +$AlCl_3$+HCl 293, 367. ♦ Спектр ЯМР 1H (500МГц, DMSO-d_6, δ, м.д., J/Гц): 12.43 (1H, с, 5-OH группы), 9.03 (1H, с, 3'-OH группы), 7.66 (1H, дд, J = 2.0 и J = 9.0, H-6'), 7.54 (1H, д, J =

		2.0, H-2'), 7.13 (1H, д, J=9.0, H-5'), 6.98 (1H, с, H-3), 3.91 (3H, с, CH₃O при C-7), 3.89 (3H, с, CH₃O при C-8), 3.84 (3H, с, CH₃O при C-6), 3.82 (3H, с, CH₃O при C-4'). ♦ Спектр ЯМР ¹³C (125.78 МГц, DMSO-d₆, δ_C, м.д.): 183.22 (C-4), 163.96 (C-7), 162.95 (C-2), 162.95 (C-5), 152.74 (C-9), 152.74 (C-3'), 149.53 (C-4'), 134.70 (C-6), 133.42 (C-8), 128.75 (C-6'), 123.54 (C-2'), 120.41 (C-1'), 120.41 (C-5'), 105.63 (C-10), 103.59 (C-3), 62.36 (CH₃O при C-7), 61.46 (CH₃O при C-8), 56.31 (CH₃O при C-6), 56.26 (CH₃O при C-4'). ♦ Масс-спектр: HR-ESI-MS <i>m/z</i> 373.0926 [M-H]⁻, <i>m/z</i> 375.1016 [M+H]⁺, <i>m/z</i> 397.0895 [M+Na]⁺, <i>m/z</i> 413.0634 [M+K]⁺.
5.	Лютеолин 5,7,3',4'-тетрагидроксифлавонон 	Кристаллы желтого цвета состава C₁₅H₁₀O₆ с т.пл. 226-229 °C (водный спирт); λ_{max} EtOH 257, 268 нм, 357 нм; +NaOAc 257, 269 (пл), 391 нм; +AlCl₃, 279, 331, 356, 402 нм.
6.	Цинарозид 7-O-b-D- глюкопиранозид лютеолина 	Кристаллы светло-желтого цвета состава C₂₁H₂₀O₁₁ с т.пл. 232-234 °C (водный спирт); λ_{max} EtOH 257, 266 нм, 352 нм; +NaOAc 258, 268 (пл), 380 нм; +AlCl₃, 276, 330, 350, 394. ♦ Спектр ЯМР ¹H (399.78 МГц, DMSO-d₆, δ, м.д., J/Гц): 12.95 (1H, с, 5-OH группы), 9.72 (2H, уш.с, 3'-OH-группа и 4'-OH-группа), 7.42 (1H, дд, 9.0 и 2.0 Гц, H-6'), 7.38 (1H, д, 2.0 Гц, H-2'), 6.87 (1H, д, 9.0 Гц, H-5'), 6.75 (1H, д, 2.0 Гц, H-8), 6.71 (1H, с, H-3), 6.40 (1H, д, 2 Гц, H-6), 5.05 (1H, д, 7.0 Гц, H-1''), 3.23-3.67 (6H, м, 6H глюкозы).
7.	Сахароза 	C₁₂H₂₂O₁₁; бесцветные моноклинные кристаллы, растворимые в воде. ♦ Масс-спектр: HR-ESI-MS <i>m/z</i> 341.1087 [M-H]⁻, <i>m/z</i> 365.1048[M+Na]⁺.

Выделенные соединения (1-6), а также сальвианоловая кислота В, полученная методом препаративного хроматографического анализа, использовались при разработке методики определения подлинности листьев мяты перечной.

3. Разработка методики определения подлинности

С целью совершенствования методики определения биологически активных веществ листьев мяты перечной методом тонкослойной хроматографии (ТСХ) нами были проведены хроматографические исследования и выявлен ряд особенностей хроматографических профилей изучаемых объектов. В качестве стандартов использовались вещества, выделенные из листьев мяты перечной методом препаративной ТСХ и СО хлорогеновой кислоты.

Из представленных результатов видно, что разделение исходного извлечения происходит более полно в системе хлороформ– этанол – вода (26 : 16 : 3), что позволяет наблюдать флуоресценцию пятен веществ, соответствующих вышеперечисленным гидроксикоричным кислотам (рис. 6). При этом доминирующим фенолпропаноидом водно-спиртового извлечения является розмариновая кислота (рис. 6). В связи с этим представляется актуальным, на наш взгляд, при определении подлинности листьев мяты

перечной (ФС.2.5.0029.15 раздел «Определение основных групп биологически активных веществ») в методе ТСХ использовать СО розмариновой кислоты.

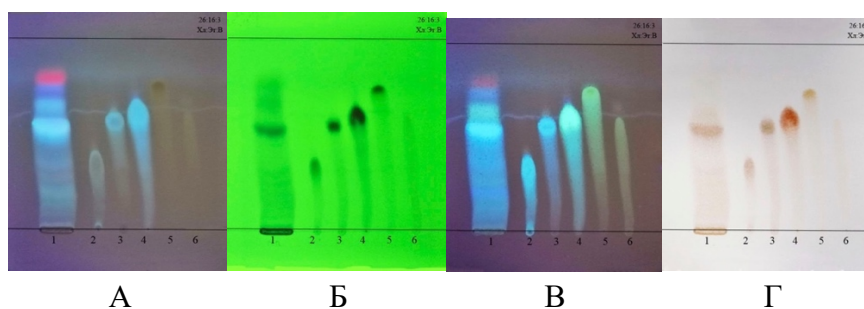


Рисунок 6 - Хроматограмма анализа водно-спиртового извлечения листьев мяты перечной в системе растворителей хлороформ – этанол – вода (26 : 16 : 3). Обозначения: А - детекция в УФ-свете до проявления при длине волны 366 нм, Б - детекция в УФ-свете до проявления при длине волны 254 нм, В - детекция в УФ- свете при длине волны 366 нм после обработки спиртовым раствором $AlCl_3$, Г - детекция после обработки раствором ДСК, 1 - настойка листьев мяты перечной; 2 – хлорогеновая кислота; 3 – розмариновая кислота; 4 – сальвианоловая кислота В; 5 – лютеолин, 6 – цинарозид.

4. Разработка методики количественного определения суммы фенилпропаноидов в процентах в пересчете на розмариновую кислоту и абсолютно сухое сырье.

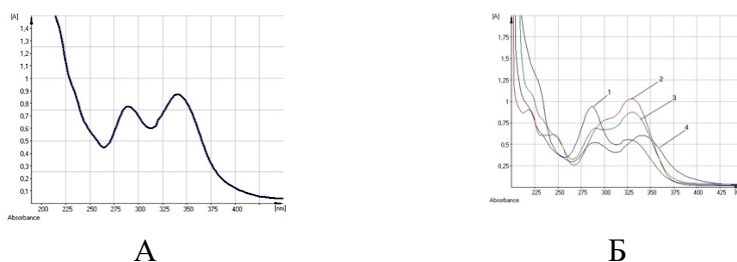


Рисунок 7 – Электронные прямые спектры растворов А - водно-спиртового извлечения листьев мяты перечной; Б – индивидуальных веществ и извлечения листьев мяты перечной

Обозначения: 1 - сальвианоловая кислота В, 2 - хлорогеновая кислота, 3 - розмариновая кислота, 4 - экстракт листьев мяты перечной.

Сравнительное изучение УФ-спектров водно-спиртового извлечения из листьев мяты перечной и растворов фенилпропаноидов показало, что хлорогеновая кислота, розмариновая кислота, сальвианоловая кислота В во многом определяют характер кривой поглощения водно-спиртового извлечения из листьев мяты перечной (рис. 7). Следовательно, УФ-спектр извлечения из листьев мяты перечной может быть использован для определения подлинности данного сырья (раздел «Идентификация»). Принимая во внимание тот факт, что в соответствии с Европейской фармакопеей для определения качества сухого экстракта из мяты перечной используется определение содержание розмариновой кислоты методом ВЭЖХ, представляется целесообразным проведение оценки качества изучаемого сырья по сумме фенилпропаноидов в пересчете на розмариновую кислоту методом спектрофотометрии.

С целью разработки методики количественного определения суммы фенилпропаноидов в листьях мяты перечной были определены основные параметры пробоподготовки. Результаты исследования зависимости различных параметров экстракции на выход действующих веществ из сырья показали, что оптимальными условиями экстракции являются: степень измельчения сырья до размера частиц 2 мм, однократное извлечение 60% этиловым спиртом на кипящей водяной бане в течение 60 минут в соотношении «сырье- экстрагент» - 1:50. Пересчет суммы фенилпропаноидов проводили на розмариновую кислоту.

Методика количественного определения суммы фенилпропаноидов в листьях мяты перечной.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 60% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 мин. Затем ее охлаждают в течение 30 мин, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр (красная полоса). Испытуемый раствор готовят следующим образом: 1 мл полученного извлечения помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл и доводят объем до метки спиртом этиловым 96% (испытуемый раствор А). Измеряют оптическую плотность испытуемого раствора на спектрофотометре при длине волны 326 нм.

Приготовление раствора стандартного образца розмариновой кислоты.

Около 0,025 г (точная навеска) розмариновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в 20 мл 96% этилового спирта. После охлаждения содержимого колбы до комнатной температуры доводят объем раствора 96% этиловым спиртом до метки (раствор А розмариновой кислоты). 1 мл раствора А розмариновой кислоты помещают в мерную колбу на 50 мл и доводят объем до метки спиртом этиловым 96% (испытуемый раствор Б розмариновой кислоты).

Содержание суммы фенилпропаноидов в пересчете на розмариновую кислоту и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{D \cdot m_0 \cdot 50 \cdot 50 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{D_0 \cdot m \cdot 1 \cdot 50 \cdot 50 (100 - W)},$$

где

D – оптическая плотность испытуемого раствора;

D₀ – оптическая плотность раствора СО розмариновой кислоты;

m – масса сырья, г;

m₀ – масса СО розмариновой кислоты, г;

W – потеря в массе при высушивании, %.

Метрологические характеристики методик количественного определения содержания суммы фенилпропаноидов в водно-спиртовом извлечении листьев мяты перечной представлены в таблице 2.

Ошибка единичного определения суммы фенилпропаноидов листьев мяты перечной с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 2,10\%$ (табл. 2).

Валидационная оценка разработанной методики проводилась по показателям: специфичность, линейность, правильность. Специфичность методики определялась по соответствию максимумов поглощения комплекса фенилпропаноидов в листьях мяты перечной и раствора СО розмариновой кислоты. Линейность методики определяли для серии растворов водно-спиртовых извлечений из листьев мяты перечной (рис. 8) (с концентрациями в диапазоне от 0,0071 до 0,0237 мг/мл) при длине волны 326 нм. Коэффициент корреляции составил 0,9880.

Таблица 2 - Результаты оценки прецизионности методики количественного определения суммы фенилпропаноидов в листьях мяты перечной

n	f	$\bar{X}$, %	S	$S_{\bar{X}}$	P, %	T (P,t) (табл.)	$\pm \Delta X$	E, %
11	10	6,9782	0,2177	0,0656	95	2,23	0,1465	$\pm 2,10$

Установлено, что содержание фенилпропаноидов в исследуемом образце сырья составляет $3,50 \pm 0,03\%$. Таким образом, исходя из результатов валидационной оценки результатов эксперимента, можно сделать вывод о пригодности использования данной методики для количественной оценки суммы фенилпропаноидов в пересчете на розмариновую кислоту. Для подтверждения пригодности методики для определения суммы фенилпропаноидов в листьях мяты перечной, нами были проанализированы пять образцов сырья листьев мяты перечной. Определено, что содержание суммы фенилпропаноидов в пересчете на розмариновую кислоту в листьях мяты перечной варьирует $3,52 \pm 0,03\%$ до $9,23 \pm 0,06\%$. Нижний предел содержания суммы фенилпропаноидов в пересчете на розмариновую кислоту составляет не менее 3%.

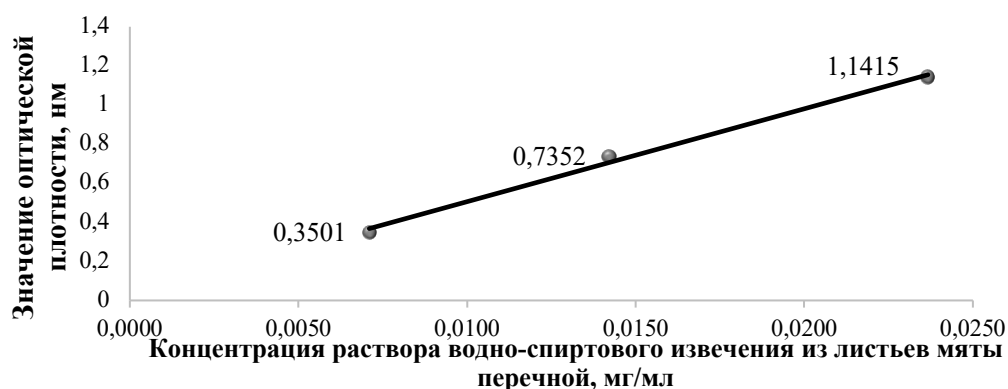


Рисунок 8 - Зависимость значений оптической плотности раствора водно-спиртового извлечения от концентрации раствора водно-спиртового извлечения из листьев мяты перечной.

5. Разработка методики количественного определения содержания розмариновой кислоты методом ВЭЖХ

При ВЭЖХ-анализе извлечения из листьев мяты в указанных условиях хроматографирования идентифицированы хлорогеновая кислота, кофейная кислота, цинарозид, розмариновая кислота, лютеолин и 5,3'-дигидрокси-6,7,8,4'-

тетраметоксифлавона (рис. 9). Флавоноид 5,3'-дигидрокси-6,7,8,4'-тетраметоксифлавона был впервые выделен из листьев мяты перечной.

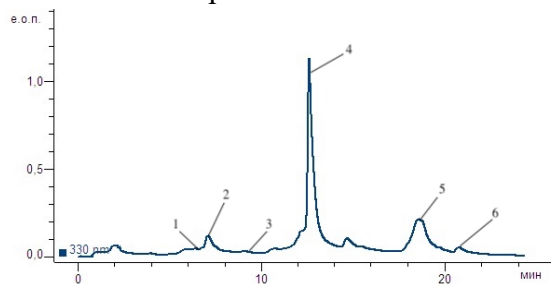


Рисунок 9 - ВЭЖХ- хроматограмма извлечения из листьев мяты перечной: 1- хлорогеновая кислота; 2 - кофейная кислота; 3 - цинарозид; 4 – розмариновая кислота; 5 - лютеолин; 6 - 5,3'-дигидрокси-6,7,8,4'-тетраметоксифлавона.

Аналитическую пробу сырья измельчают до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Около 1 г измельченного сырья (точная навеска) помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, прибавляют 50 мл 60% этилового спирта. Колбу закрывают пробкой и взвешивают на тарированных весах с точностью до $\pm 0,01$. Колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане (умеренное кипение) в течение 60 минут. Затем колбу охлаждают в течение 30 минут, закрывают той же пробкой, снова взвешивают и восполняют недостающий экстрагент до первоначальной массы. Извлечение фильтруют через бумажный фильтр («Синяя лента»). Перед хроматографическим анализом дополнительно фильтруют через мембранный фильтр Milipore (0,22 мкм).

В жидкостной хроматограф «Миличром-6» (НПАО «Научприбор») с УФ-детектором вводят 2 мкл полученного раствора. Хроматографируют в условиях прямой хроматографии в изократическом режиме на стальной колонке «КАХ-6-80-4» (№2; 2 мм x 80 мм; Сепарон-С18 7 мкм), элюентная система: ацетонитрил (ПФА) – 1% раствор уксусной кислоты (ПФБ), скорость элюирования – 100 мкл/мин, объем пробы испытуемого раствора – 2 мкл. Проводят УФ-детектирование при длине волны 340 нм, диапазон чувствительности 0,5. Проводят не менее 3 параллельных определений. Соотношение компонентов в элюентной системе равняется 2:8.

Параллельно 10 мкл раствора розмариновой кислоты вводят в хроматограф и хроматографируют, как описано выше. Определяют время удерживания и идентифицируют пик розмариновой кислоты на хроматограмме испытуемого раствора. Вычисляют высоту пика розмариновой кислоты на хроматограмме и рассчитывают среднюю высоту пика по 3 параллельным определениям.

Содержание розмариновой кислоты в листьях мяты перечной в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$x = \frac{H * m_0 * V * V_2 * 100 * 100}{H_0 * m * V_0 * V_1 * (100 - W)},$$

Где H – среднее значение высоты пика розмариновой кислоты испытуемого раствора, вычисленное из хроматограмм раствора испытуемого образца; H_0 – среднее значение высоты пика раствора СО розмариновой кислоты, вычисленное из хроматограмм раствора РСО розмариновой кислоты; V – объем извлечения, мл; V_1 – объем вводимой

пробы раствора испытуемого образца, мкл; V_0 – объем раствора СО розмариновой кислоты, мл; V_2 – объем вводимой пробы раствора РСО розмариновой кислоты, мкл; m – масса сырья, г; m_0 – масса СО розмариновой кислоты, г; W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Метрологические характеристики разработанной методики ВЭЖХ-анализа свидетельствуют о том, что ошибка единичного определения содержания розмариновой кислоты в листьях мяты перечной с доверительной вероятностью 95% составляет $\pm 2,91\%$. (табл. 3).

Таблица 3 - Метрологические характеристики методики количественного определения розмариновой кислоты в листьях мяты перечной

n	f	$\bar{X}, \%$	S^2	S	$S_{\bar{X}}$	P, %	t (P, f)	$\pm \Delta X$	$\pm \Delta \bar{X}$	E, %	$\bar{E}, \%$
11	10	4,23	0,03	0,18	0,06	95	2,23	0,41	0,12	9,66	2,91

Установлено, что содержание розмариновой кислоты в исследуемых образцах варьирует от $1,76 \pm 0,04 \%$ до $5,54 \pm 0,05 \%$, нижний предел содержания не менее 1,5%.

6. Обоснование перспективности использования сортовых форм и видов мяты в медицинской практике

При проведении сравнительного фитохимического исследования водно-спиртовых извлечений из листьев сортовых форм и некоторых видов рода *Mentha* L. Результаты исследования показали, что в образцах мяты перечная сорт «Шоколадная», мята перечная сорт «Карамельная», мята перечная сорт «Ментоловая», основным компонентом являются фенилпропаноиды (рис. 10). Определено, что содержание суммы фенилпропаноидов в пересчете на розмариновую кислоту составляет от $3,47 \pm 0,06\%$ до $13,03 \pm 0,05\%$. Нижний предел содержания суммы фенилпропаноидов в пересчете на розмариновую кислоту составляет не менее 3%. Полученные данные говорят о перспективности использования данных сортовых форм, как источника фенилпропаноидов.

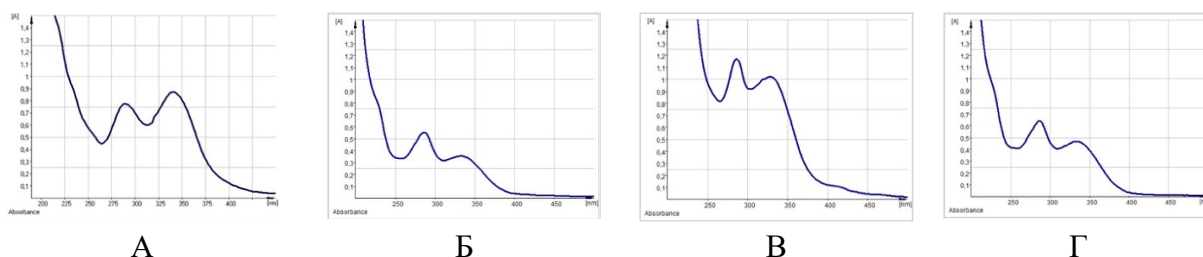


Рисунок 10 - Электронный прямой спектр раствора водно-спиртового извлечения листьев мяты перечной: А - АО Красногорсклектравы, Рег.№ ЛП-003986; Б – сорт «Карамельная»; В – сорт «Ментоловая»; Г – сорт «Шоколадная».

Также было проведено сравнительное фармакологическое исследование сортовых форм и некоторых видов рода *Mentha* L., флавоноидов – лютеолина и 5,3'-дигидрокси-4,7,8,4'-тетраметоксифлавона, а также ментола. Подтверждено, что сухие экстракты мяты перечной сорт «Шоколадная» и мяты длиннолистной обладают выраженной диуретической активностью. Сухой экстракт мяты длиннолистной проявляет антидепрессантное действие, а 5,3'-дигидрокси-4,7,8,4'-тетраметоксифлавоны и сухой экстракт листьев мяты перечной снижают двигательную активность животных на 73%, проявляя седативный эффект. При исследовании антимикробной активности наиболее показательными были результаты

водно-спиртовых извлечений из листьев мяты круглолистной сорт «Ананасная» (70% спирт этиловый) и листьев мяты перечной сорт «Ментоловая» (70% спирт этиловый). Относительно штаммов *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* растворы лютеолина, ментола проявили высокую противомикробную активность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное фармакогностическое исследование видов и сортов рода Мята (*Mentha* L.) позволило сформулировать следующие выводы:

1. В результате проведения анатомо-гистологического исследования листа мяты перечной (*Mentha piperita* L.) были выявлены наиболее важные диагностические признаки черешка, такие как очертание поперечного сечения черешка, имеющего ланцетную форму с изломом по середине к верхней стороне листа с тупым углом, достигающим 140°.
2. Люминесценция протопластов железистых трихом указывает на наличие в секрете под кутикулой монотерпенов (ментола) и флавоноидов. Основная концентрация флавоноидов, вероятнее всего, локализована во флоэмной части проводящей системы в виде кристаллических веерообразных образований, имеющих характерную для флавоноидов желто-оранжевую люминесценцию в диапазоне возбуждения 330-400 нм. Фенилпропаноиды (розмариновая кислота) локализованы в клетках мезофилла черешка и могут быть обнаружены по ярко-голубой люминесценции в диапазоне возбуждения 330-400 нм.
3. Из листьев мяты перечной выделены 7 индивидуальных соединений, относящихся к фенилпропаноидам (розмариновая кислота и кофейная кислота), флавоноидам (5,4'-дигидрокси-6,7,3'-триметоксифлавоны, 5,3'-дигидрокси-6,7,8,4'-тетраметоксифлавоны, лютеолин и цинарозид) и углеводам (сахароза), которые идентифицированы с помощью УФ-, ¹H-ЯМР- и ¹³C-ЯМР- спектроскопии, масс-спектрометрии. Следует отметить, что 5,4'-дигидрокси-6,7,3'-триметоксифлавоны впервые описаны для листьев мяты перечной (*Mentha piperita* L.), а 5,3'-дигидрокси-6,7,8,4'-тетраметоксифлавоны впервые выделены в России из листьев мяты перечной (*Mentha piperita* L.).
4. Разработана методика количественного определения суммы фенилпропаноидов в пересчете на розмариновую кислоту методом прямой спектрофотометрии. Содержание суммы фенилпропаноидов в листьях мяты перечной варьирует от 3,52±0,03% до 9,23±0,06%. Нижний предел – не менее 3%. Результаты сравнительного изучения компонентного состава сырья сортовых форм мяты перечной мяты круглолистной сорт «Ананасная» и мяты курчавой показали, что содержание суммы фенилпропаноидов в которых в абсолютно сухом сырье (в %) в пересчете на розмариновую кислоту варьирует от 3,47±0,06% до 13,03±0,04%. Полученные результаты позволили сделать вывод о перспективности использования сортовых форм и некоторых видов мяты в качестве источника фенилпропаноидов.
5. Разработана методика количественного определения розмариновой кислоты методом ВЭЖХ. Результаты проведенных исследований свидетельствуют о целесообразности стандартизации листьев мяты перечной путем определения содержания доминирующего и диагностически значимого фенилпропаноида –

розмариновой кислоты с использованием метода ВЭЖХ и детектированием на УФ-детекторе при длине волны 330 нм. Содержание розмариновой кислоты в образцах листьев мяты перечной варьирует от $1,76 \pm 0,04\%$ до $5,54 \pm 0,05\%$.

6. В результате исследования компонентного состава листьев мяты перечной, а также некоторых сортов и видов мяты методом ВЭЖХ обнаружены такие вещества, как розмариновая кислота, хлорогеновая кислота, кофейная кислота, 5,3'-дигидрокси-6,7,8,4'-тетраметоксифлавоны, лютеолин и цинарозид.
7. В результате исследования биологической активности сухих экстрактов из листьев некоторых сортов и видов мяты и некоторых индивидуальных веществ определено, что выраженную диуретическую активность показали сухой экстракт листьев мяты перечной, мяты перечной сорт «Шоколадная» и мяты длиннолистной. В результате исследования нейротропной активности сухого экстракта мяты длиннолистной определено его антидепрессантное действие, однако сухой экстракт листьев мяты перечной и 5,3'-дигидрокси-4,7,8,4'-тетраметоксифлавоны наоборот снижали двигательную активность животных на 73%, проявляя седативный эффект. В результате исследования антимикробной активности водно-спиртовые извлечения из листьев некоторых сортов и видов мяты перечной наибольший антимикробный эффект показали извлечения из листьев мяты перечной сорт «Ананасная» и сорт «Ментоловая».
8. Разработан проект дополнений к ФС «Мята перечная» для включения в Государственную фармакопею Российской Федерации (разделы «Микроскопические признаки», «Идентификация» и «Количественное определение»).

Практические рекомендации. Результаты диссертационной работы будут способствовать совершенствованию подходов в стандартизации ЛРС, содержащего фенилпропаноиды и флавоноиды, и могут быть использованы в учебно-образовательных процессах по дисциплинам «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия», а также в организациях и предприятиях, специализирующихся в области создания, стандартизации, сертификации и контроля качества ЛС и ЛП.

Перспективы дальнейшей разработки. Проведение дальнейших исследований объектов диссертационной работы имеет научно-практическое значение для решения актуальных задач фармации в области фармакогнозии и фармацевтической химии. Планируется осуществление экспериментально-аналитической работы по углубленному изучению химического состава других видов растений рода *Mentha* L., и последующая разработка современных, объективных и унифицированных подходов к стандартизации новых видов лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Казакова, М.А. Сравнительное микробиологическое и фитохимическое исследование извлечений из листьев сортовых форм рода *Mentha* L. / М.А. Казакова, В.А. Куркин, В.М. Рыжов, А.В. Лямин, А.В. Козлов // **Разработка и регистрация лекарственных средств.** – 2025. – Т. 14, №1. – С. 265-273 – DOI 10.33380/2305-2066-2025-14-1-1932.
2. Казакова, М.А. Исследование компонентного состава листьев мяты перечной методом ВЭЖХ / М.А. Казакова, В.А. Куркин, А.Р. Мубинов // **Фармация.** – 2023. – Т. 72, № 8. – С. 33-38.

3. Куркин, В.А. Разработка методики количественного определения суммы фенилпропаноидов в листьях мяты перечной / В.А. Куркин, М.А. Казакова // **Химия растительного сырья**. – 2024. – № 3. – С. 161-168.
4. Куркин, В.А. Определение содержания розмариновой кислоты в листьях мяты перечной методом ВЭЖХ / В.А. Куркин, М.А. Казакова, А.Р. Мубинов // **Химико-фармацевтический журнал**. – 2024. – Т. 58, № 4. – С. 35-40.
5. Kazakova, M.A. Determination of the Rosmarinic Acid Content in *Mentha piperita* L. Leaves by HPLC / M.A. Kazakova, A.R. Mubinov, V.A. Kurkin // **Pharmaceutical Chemistry Journal**. – 2024. – Vol. 58, No. 4. – P. 661-665.
6. Казакова, М.А. Фитохимическое исследование мяты перечной *Mentha piperita* L. методом ВЭЖХ / М.А. Казакова, В.А. Куркин // XXV Международный Съезд ФИТОФАРМ 2024 : сборник тезисов, Санкт-Петербург, 07–09 октября 2024 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, 2024.
7. Казакова, М.А. Сравнительное спектрофотометрическое исследование извлечений из листьев некоторых видов и сортов представителей рода мята (*Mentha* L.) / М.А. Казакова, В.А. Куркин // Достижения и перспективы создания новых лекарственных средств растительного происхождения: Сборник материалов Международной конференции, Москва, 07 июня 2024 года. – Москва: Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений, 2024. – С. 341-344.
8. Казакова, М.А. Флавоноиды и фенилпропаноиды листьев мяты перечной (*Mentha piperita* L.) / М.А. Казакова, В.А. Куркин // Современные проблемы фармации : Сборник научных трудов III Научно-практической онлайн-конференции с международным участием, посвященной 105-летию Самарского государственного медицинского университета, Самара, 18–19 ноября 2024 года. – Самара: Самарский государственный медицинский университет, ООО "Полиграфическое объединение "Стандарт", 2024. – С. 225-228.
9. Казакова, М. А. Сравнительное спектрофотометрическое исследование листьев различных сортов представителей рода *Mentha* L. / М. А. Казакова // Молодая фармация – потенциал будущего : Сборник материалов XIV всероссийской научной конференции с международным участием Молодежного научного общества СПХФУ, Санкт-Петербург, 28 марта – 02 2024 года. – Санкт-Петербург: Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, 2024. – С. 615-617.
10. Казакова, М. А. Актуальные проблемы стандартизации мяты перечной / М. А. Казакова, В. А. Куркин // Актуальные проблемы и перспективы фармацевтической науки и практики: материалы III Международной научно-практической конференции, Кемерово, 26 мая 2023 года. – Кемерово, 2023. – С. 259-264.
11. Казакова, М. А. Сравнительный спектрофотометрический анализ сортовых форм мяты перечной (*Mentha piperita* L.) / М. А. Казакова // Аспирантские чтения - 2023: молодые ученые - медицине. Приоритетные на-правления науки в достижении технологического суверенитета : Сборник материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Самара, 25 октября 2023 года. – Самара: ООО "Полиграфическое объединение "Стандарт", 2024. – С. 338-341.
12. Казакова, М.А. Сравнительный морфолого-анатомический и химический анализ представителей рода мята (*Mentha* L.) / М.А. Казакова // Студенческая наука и медицина XXI века: традиции, инновации и приоритеты : XIV Всероссийская (88-я Итоговая) студенческая научная конференция СНО с международным участием, посвященная 90-летию Клиник СамГМУ, Самара, 14 октября 2020 года. – Самара: ООО «Офорт», 2020. – С. 258-259.
13. Казакова, М. А. Морфолого-анатомический анализ корневищ мяты перечной *Mentha piperita* L. / М. А. Казакова, В. М. Рыжов, Л. В. Тарасенко // Фармацевтическая

- ботаника: современность и перспективы : Сборник материалов IV Межвузовской научно-практической конференции, посвященной 100-летию Самарского государственного медицинского университета, Самара, 28 сентября 2019 года / Под редакцией В.А. Куркина. – Самара: Самарский государственный медицинский университет, 2019. – С. 185-191.
14. Минько, О.В. Изучение противомикробной активности извлечений из листьев мяты перечной в отношении штаммов муковисцидоза / О. В. Минько, М. А. Казакова, В. М. Рыжов [и др.] /// Современные проблемы фармакогнозии : Сборник материалов III Межвузовской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 100-летию Самарского государственного медицинского университета, Самара, 27 октября 2018 года / Под редакцией В.А. Куркина. – Самара: Самарский государственный медицинский университет, 2018. – С. 149-153.
 15. Казакова, М.А. Изучение противомикробной активности флавоноидов листьев мяты перечной в отношении штаммов муковисцидоза / М.А. Казакова, О.В. Минько, С.С. Миронова [и др.] // Фенольные соединения: свойства, активность, инновации : Сборник научных статей по материалам X Международного симпозиума, Москва, 14–19 мая 2018 года / Ответственный редактор Н.В. Загоскина. – Москва: PRESS-BOOK.RU, 2018. – С. 449-453.
 16. Рыжов, В. М. Изучение возможности комплексной переработки мяты длиннолистной *Mentha longifolia* L. / В. М. Рыжов, М. А. Казакова // Современные аспекты использования растительного сырья и сырья природного происхождения в медицине : V научно-практическая конференция, Москва, 15 марта 2017 года / под редакцией И.А. Самылиной, А.Н. Луферова, Институт фармации и трансляционной медицины, Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации. – Москва: Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), 2017. – С. 185-188.
 17. Казакова, М.А. Люминесцентная микроскопия мяты перечной (*Mentha piperita* L.) / М.А. Казакова // Роль молодёжи в развитии медицинской науки : Материалы XII научно-практической конференции молодых учёных и студентов ТГМУ им. Абуали ибни Сино с международным участием, посвящённой «Году молодёжи», Душанбе, 28 апреля 2017 года / Таджикский государственный медицинский университет им. Абу Али Ибн Сины. – Душанбе: Таджикский государственный медицинский университет им. Абуали ибни Сино, 2017. – С. 304.
 18. Куркин, В. А. Фитохимическое исследование корневищ мяты длиннолистной / В. А. Куркин, В. М. Рыжов, М. А. Казакова // Молодой ученый. – 2016. – № 10 (114). – С. 396-399.

Патент

Патент на изобретение № 2833834 С1 Российская Федерация, МПК А61К 36/534; А61К 31/235; G01N 30/02; G01N 30/06; G01N 30/74. Способ количественного определения розмариновой кислоты в листьях мяты перечной: № 2024120295: заявл. 18.07.2024; опубл. 29.01.2025 / М.А. Казакова, В.А. Куркин; заявитель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Самарский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации.