

*На правах рукописи*



**Лёзина  
Алёна Владимировна**

**ФИТОХИМИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА И СТАНДАРТИЗАЦИЯ СЫРЬЯ РОДИОЛЫ  
ЧЕТЫРЕХЛЕПЕСТНОЙ И ОРТИЛИИ ОДНОБОКОЙ**

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Санкт-Петербург

2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

**Тернинко Инна Ивановна**

доктор фармацевтических наук, доцент

Официальные оппоненты:

**Кудашкина Наталья**

доктор фармацевтических наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, декан фармацевтического факультета, заведующая кафедрой фармакогнозии с курсом ботаники и основ фитотерапии

**Владимирова**

**Ханина Миниса Абдуллаевна**

доктор фармацевтических наук, профессор, государственное образовательное учреждение высшего образования Московской области «Государственный гуманитарно-технологический университет», заведующая кафедрой фармацевтической химии и фармакогнозии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пермская государственная фармацевтическая академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «14» марта 2023 года в 14.00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.063.01, созданного на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197022, г. Санкт-Петербург, ул. Профессора Попова, д.14, лит. А).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (197227, г. Санкт-Петербург, пр. Испытателей, д.14) и на сайте организации (<https://sites.google.com/a/pharminnotech.com/dissovet>).

Автореферат разослан « \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 20\_\_ г.

Ученый секретарь

диссертационного совета 21.2.063.01,  
кандидат фармацевтических наук, доцент



Орлов А.С.

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы исследования.** Фармация является одной из наиболее социально значимых и ориентированных отраслей промышленности, что обусловлено тенденцией к монотонному росту и хронизации различных патологических состояний и, как следствие, необходимостью поиска новых препаратов направленного действия. По данным А.А. Лина, инвестиционные объемы в фармацевтическую индустрию и науку составляют 150 млрд. долларов в год (по данным 2015 года).

Научный поиск потенциальных лекарственных кандидатов характеризуется многовекторностью и охватывает классы соединений различного происхождения: синтетические, природные, биотехнологические и др. Лекарственное растительное сырье (ЛРС) имеет давнюю историю применения и, являясь элементом этнофармакологии, остается в фокусе научных групп как одно из целевых направлений для поиска новых биологически активных веществ (БАВ), кроме того фитопрепараты характеризуются лучшей биодоступностью, возможностью применения в различных возрастных группах, а также плеiotропным действием БАВ и способностью к потенцированию. Это обуславливает рост потребления лекарственных продуктов растительного происхождения, который в 2011 году составил более 20 млрд долларов.

Однако отсутствие четких параметров стандартизации по конкретному соединению и экспериментальных данных, достаточных для целей доказательной медицины, ограничивает введение большинства лекарственных растений (ЛР) в официальную практику и оставляет их в плоскости биологически активных добавок (БАД), стандартизация которых существенно отличается от общепринятых подходов в фармацевтическом контроле качества.

Так, БАД на основе ЛРС родиолы четырехлепестной (*Sedum quadrifidum* Pall. – syn. *Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. & C.A. Mey. (красная щетка) и ортилии однобокой (*Orthilia secunda* L. (матка боровая) пользуются спросом у населения. Данные растения позиционируются фитотерапевтами и народной медициной как средства для лечения заболеваний женской репродуктивной системы. Данные о комплексном фитохимическом составе этих растений в научной литературе ограничены. Отдельные авторы (Ботоева Е.А.) отмечают, что ортилия однобокая содержит флавоноиды, иридоиды, дубильные вещества, витамины. Наличие салидрозида в родиоле четырехлепестной было показано в работе К. Хохловой и О. Здрок. Японскими учеными установлено в корневищах родиолы четырехлепестной наличие флавоноидов и цианогликозидов. Однако отсутствие системной фитохимической оценки ортилии однобокой и родиолы четырехлепестной с установлением маркерных групп БАВ / отдельных соединений и критериев стандартизации ЛРС данных растений ограничивает их медицинское применение. Это создает предпосылки для комплексного фитохимического исследования ЛРС *Orthilia secunda* L. и *Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. & C.A. Mey., с последующим установлением критериев их стандартизации и обуславливает тему исследования как актуальную.

**Степень разработанности темы исследования.** Фармакогностическая характеристика травы ортилии однобокой отражена в работе Ломбоевой С.С. Отдельные разрозненные данные о фитохимическом составе представлены в работах Ботоевой Е.А. Однако вопросы количественной оценки отдельных маркерных соединений, в т. ч. в сравнительном аспекте по зонам заготовки, маркерных групп БАВ, в научной литературе не освещены. Информация в научной литературе о фитохимическом составе ЛРС родиолы четырехлепестной не носит системного характера и немногочисленна. Значительная часть исследований в ряду растений рода *Rhodiola* spp. посвящена официальному фармакопейному виду родиоле розовой.

**Цель и задачи исследования.** Целью работы является комплексное фитохимическое профилирование ЛРС ортилии однобокой и родиолы четырехлепестной с выделением маркерных соединений и последующей стандартизацией, а также разработка растительной композиции на их основе.

Для достижения поставленной цели необходимо было решение следующих задач:

1. Исследовать фитохимический состав ЛРС ортилии однобокой и родиолы четырехлепестной и установить маркерные группы БАВ;
2. Провести количественную оценку родоспецифичных фенольных соединений, определяющих фитохимический профиль растений рода *Rhodiola* для 3 видов в сравнительном аспекте;
3. Изучить макро- и микроэлементный профиль растений - объектов исследования и сформировать вывод об их избирательном накоплении;
4. Выделить индивидуальные соединения из корневищ с корнями родиолы четырехлепестной, установить их структуру и провести прогностическую оценку биологического действия с помощью программы PASS;
5. Предложить критерии стандартизации травы ортилии однобокой и корневищ с корнями родиолы четырехлепестной, разработать проекты ФС;
6. Разработать оптимальный состав растительного сбора из сырья ортилии однобокой и родиолы четырехлепестной, выбрать критерии его стандартизации и провести валидационную и верификационную оценку использованных аналитических методик.

**Научная новизна исследования.** Впервые проведено комплексное фитохимическое исследование и стандартизация лекарственного растительного сырья родиолы четырехлепестной и установлены маркерные группы БАВ сырья ортилии однобокой, что способствует расширению ассортимента растений – потенциальных лекарственных кандидатов.

В траве ортилии однобокой установлено наличие и определено количественное содержание 12 макро- и микроэлементов, идентифицировано 4 органические кислоты и 11 БАВ фенольной природы: 3 гидроксикоричных кислоты (ГКК), 5 флавоноидов, 3 фенолкарбоновых кислоты (ФКК). Впервые в сырье ортилии установлено количественное содержание арбутина в сравнительном аспекте в зависимости от региона произрастания.

Впервые проведена оценка минерального состава родиолы четырехлепестной в сравнительном аспекте с официальным видом – родиолой розовой - в результате которого удалось количественно установить наличие 12 макро- и микроэлементов. Обнаружено 2 аминокислоты, 1 органическая кислота, 9 соединений фенольной природы, 2 из которых относятся к родоспецифичным фенольным соединениям растений рода *Rhodiola*, 3 ГКК, 3 флавоноида и 1 фенолкарбоновая кислота (ФКК). Впервые из ЛРС родиолы четырехлепестной выделено и идентифицировано 7 индивидуальных соединений - тирозол, кофейная кислота, этилгаллат, эпикатехин, катехин, п-гидроксibenзойная кислота, 3,4-дигидроксibenзойная кислота - которые накапливаются в мажоритарном количестве и составляют ее фитохимический профиль.

Впервые доказано, что для родиолы четырехлепестной не характерно наличие специфических для фармакопейного вида производных коричного спирта.

**Теоретическая и практическая значимость работы.** Предложена методика последовательного фракционирования и выделения индивидуальных соединений из корней и корневищ родиолы четырехлепестной методами колоночной и препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Для выделенных соединений методом прогностической оценки с помощью программы PASS приведены направления

фармакологической активности с наибольшей вероятностью, что создает предпосылки для направленной разработки и проведения доклинического изучения лекарственных препаратов на их основе с целевым действием.

Применена фармакопейная методика количественного определения родоспецифичных фенольных соединений для сырья родиолы четырехлепестной методом ВЭЖХ, проведена ее верификация и установлены критерии пригодности хроматографической системы.

Применительно к сырью ортилии и растительной композиции на ее основе успешно использована методика КО галловой кислоты методом УФ-спектрофотометрии с расчетом по методу Фирордта. Проведена валидационная оценка данной методики, доказана ее воспроизводимость.

Предложен оптимальный состав сбора на основе сырья родиолы и ортилии, разработаны критерии его стандартизации.

Разработанные критерии стандартизации легли в основу 2 проектов фармакопейных статей (ФС) «Родиолы четырехлепестной корневища и корни» и «Ортилии однобокой трава», а также проекта нормативной документации (НД) «Сбор гинекологический №1».

Установлены технологические параметры и числовые фармакогностические характеристики ЛРС ортилии однобокой и родиолы четырехлепестной, а также растительной композиции на их основе, которые могут быть использованы при разработке растительных лекарственных препаратов и приведены в проектах ФС.

Проекты ФС апробированы в производственной деятельности в (лаборатория ОКК) ООО «Фитолеум» (Республика Казахстан) (акт внедрения б/н от 6 июня 2022 г), СПб ГБУЗ «СЗЦККЛС» (акт внедрения б/н от 8 июня 2022 г), в научный (акт внедрения б/н от 15 июня 2022 г) и учебный (акт внедрения б/н от 18 июня 2022 г) процесс кафедры фармакогнозии ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России.

**Методология и методы исследования.** В работе применялись методологические подходы эксперимента, применяемого в фармакогнозии, направленного на стандартизацию ЛРС. Фитохимический анализ был проведен с применением таких классических и современных физических и физико-химических методов анализа, как хроматографические (тонкослойная, высокоэффективная тонкослойная хроматография (ВЭТСХ), колоночная хроматография, ВЭЖХ, газовая хроматография с масс-спектрометрией), спектральные (спектрофотометрия в УФ- и видимой областях спектра, атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (АЭС), спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), масс-спектрометрия). Для определения ботанических диагностических признаков ЛРС были использованы морфолого-анатомические и органолептические методы. Для установления фармакопейных числовых показателей и технологических параметров были задействованы технологические и товароведческие методы. Фармакологическую активность БАВ устанавливали с помощью программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances). Статистическую обработку полученных результатов проводили методами математической статистики в соответствии с ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента».

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

На защиту выносятся следующие положения и результаты, которые определяют научную новизну и практическую значимость работы:

1. Результаты комплексного фитохимического исследования травы ортилии однобокой и корневищ и корней родиолы четырехлепестной с установлением маркерных БАВ;
2. Профиль родоспецифичных фенольных соединений растений 3 видов рода *Rhodiola* в сравнительном аспекте;

3. Результаты выделения и изучения структуры индивидуальных соединений сырья родиолы четырехлепестной и *in silico* прогноз их фармакологической активности;
4. Результаты адаптации и валидационной оценки методики количественного определения галловой кислоты в сборе гинекологическом;
5. Критерии стандартизации травы ортилии однобокой, корневищ и корней родиолы четырехлепестной и растительной композиции «Сбор гинекологический №1» на их основе.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Основные результаты исследований докладывались и обсуждались на научных российских и международных конференциях различного уровня: X, XI, XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» (г. Санкт-Петербург, 2020, 2021, 2022); VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации» (Санкт-Петербург, 2019); международной научной конференции «Современные достижения фармацевтической науки и практики» (г. Витебск, 2019); международной научно-практической конференции «Современные достижения фармацевтической науки в создании и стандартизации лекарственных средств и диетических добавок, содержащих компоненты природного происхождения» (г. Харьков, 2021); международной научной конференции «90 лет – от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы» (г. Москва, 2021); международной научно-практической конференции «Разработка лекарственных средств-традиции и перспективы» (г. Томск, 2021).

**Публикации материалов исследования.** По теме диссертационной работы было опубликовано 12 печатных работ. Из которых 2 статьи в журналах, входящих в перечень рецензируемых научных журналов и изданий для опубликования основных научных результатов диссертаций, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 1 статья в издании, индексируемом в наукометрической базе данных Scopus, и 9 тезисов.

**Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук.** Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом исследовательских работ ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России в рамках тематики государственного задания «Разработка методологической концепции контроля качества лекарственных средств и субстанций природного происхождения с использованием инновационных аналитических методов» (регистрационный номер АААА-А20-120121790032-2 от 17.12.2020) и инициативной темы «Инновационные подходы в стандартизации лекарственных средств синтетического и природного происхождения» (номер гос. регистрации: АААА-А19-119030590044-6, зарегистрирована 05.03.2019).

**Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов.** Лёзиной А.В. совместно с научным руководителем д.фарм.н., доц. И.И. Тернинко были определены основные векторы исследовательской работы, сформулирована цель и спланированы задачи для её достижения. Литературный поиск, анализ и систематизацию данных научных публикаций Лёзина А.В. осуществляла самостоятельно. Автором лично был произведен весь объем экспериментальных работ, осуществлена интерпретация и статистическая обработка полученных результатов, их оформление в виде научных публикаций.

Экспериментальные исследования (АЭС-ИСП, ВЭЖХ, ГХ-МС, колоночная хроматография, препаративная ВЭЖХ) проводили с использованием парка оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПХФУ Минздрава России». ЯМР анализ проводили на базе парка научно-технического оборудования СПбГУ им. Петра Великого. Исследование морфолого-анатомических характеристик травы ортилии однобокой и корневищ и корней родиолы четырехлепестной проводились с помощью комплекса оборудования Ботанического

института им. В.Л. Комарова Российской академии наук (БИН РАН). Личный вклад автора составил не менее 90%.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.** Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту научной специальности 3.4.2 «Фармацевтическая химия, фармакогнозия», а именно: пункт 6 – изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе; и пункт 7 – изучение биофармацевтических аспектов стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе; изучение влияния экологических факторов на химические и биологические свойства лекарственных растений; оценка экотоксикантов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных средствах.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 188 страницах компьютерного набора, иллюстрирована 46 рисунками и 44 таблицами. Структура работы состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», 4 экспериментальных глав, заключения, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и 6 приложений. Библиография включает 135 ссылок на литературные источники, в том числе 80 ссылок на иностранных языках.

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### Глава 1. Обзор литературы

В первой главе рассмотрена актуальность применения фитопрепаратов, приведены статистические данные, демонстрирующие положительную динамику потребления растительных средств. Отдельно охарактеризована роль фитотерапии в лечении гинекологических патологий и приведены данные государственного реестра лекарственных средств (ГРЛС) по зарегистрированным растительным препаратам в этой группе нозологий. Данные реестра БАД, рекомендованных для профилактики заболеваний репродуктивной сферы, позволили определить актуальность комплексного изучения таких растительных объектов как родиола четырехлепестная (*Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. & C.A. Mey) и ортилия однобокая (*Orthilia secunda* L.). Для объектов исследования приведена ботаническая характеристика, ареал произрастания, данные о химическом составе растений, рассмотрены фармакологические эффекты и охарактеризованы аспекты применения. Направленный литературный обзор научных публикаций по теме исследования позволил обосновать актуальность комплексного фитохимического изучения травы ортилии однобокой, корневищ и корней родиолы четырехлепестной с их последующей стандартизацией.

### Глава 2. Материалы и методы исследования

В качестве объектов исследования использовали воздушно-сухую траву *Orthilia secunda*, заготовленную в различных эколого-фитоценологических зонах: в районе г. Кокшетау (север Республики Казахстан, период заготовки - июнь 2018 года); в Пермском крае (Березовский район, июль 2019 года); в Тюменской области (Сладковский район, июль 2019 года) и корневища и корни 3 видов рода *Rhodiola*: *Rh. rosea*, заготовленная в Питомнике СПХФУ в пос. Лемболово (Ленинградская область) в августе-сентябре 2020 года; *Rh. quadrifida*, приобретенная в аптечной сети г. Санкт-Петербурга (место и время заготовки по информации на упаковке – Алтай (в районе

г. Барнаул), март 2019 года) и заготовленная в конце октября 2021 года на Алтае (район г. Барнаул); *Rh. heterodonta*, заготовленная в Таджикистане (район г. Душанбе) в марте 2019 года.

Изучение объектов исследования по показателям подлинности - внешний вид и анатомические особенности - проводили в соответствии с ГФ РФ XIV ОФС.1.5.1.0002.15 «Травы», ОФС.1.5.1.0006.15 «Корни, корневища, луковицы, клубни, клубнелуковицы» и ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования ЛРС и лекарственных растительных препаратов».

Фармакопейные показатели качества (зола общая; зола нерастворимая в растворе 10% хлористоводородной кислоты; степень измельченности; содержание примесей; содержание экстрактивных веществ; влажность) устанавливали по методикам, указанными в ГФ РФ XIV издания по соответствующим ОФС.

Предварительный фитохимический скрининг проводили с помощью качественных реакций ТСХ и ВЭТСХ. ТСХ проводили на пластинках «Sorbfil UV<sub>254</sub>» (ПТСХ-П-В-УФ 10×20, зернение силикагеля 5–17 мкм, толщина слоя 110 мкм). ВЭТСХ осуществляли на приборе САМАГ, на пластинах Merck HPTLC silica gel 60 F154, 20×10.

Содержание полифенольных соединений (ПФС), галловой кислоты (ГК) и гидроксикоричных кислот (ГКК) устанавливали методом УФ-СФМ на приборе «СФ-2000» (ЗАО «ОКБ Спектр», г. С.-Петербург).

Количественное определение родоспецифичных фенольных соединений в растениях рода *Rhodiola* проводили методом ВЭЖХ (хроматограф FlexarFX-15 с УФ детектором (PerkinElmer, США), колонка Zorbax C18, 250 x 4,6 x 5 мкм). Количественное определение арбутина в траве ортилии методом ВЭЖХ проводили по валидированной методике, представленной в ЕФ 10.0 на приборе Prominence LC-20 (Shimadzu, Япония) с диодноматричным детектором SPD-M20A, колонка Intersil C18 (250×4,6 мм, 5 мкм) (Phenomenex, США). Макро- и микроэлементный состав растений устанавливали методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой на приборе «Optima 8000» (Perkin Elmer Inc., США). Идентификацию и количественную оценку отдельных веществ в сравнительных методах анализа проводили с использованием растворов соответствующих стандартных образцов (СО) пр-ва Sigma-Aldrich, TraceCERT®, Merck, LGC, PerkinElmer и ЗАО «ЦСОВВ».

Выделение индивидуальных соединений из сырья родиолы четырехлепестной проводили последовательно методами открытой колоночной (Dianion® HP-20 (Supelco, Sigma-Aldrich, Япония), Sephadex LH-20 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеция) и препаративной (Kromasil C18 (25 см × 30 мм, с размером частиц 5×10-3 мм) хроматографии. Структуру индивидуальных соединений устанавливали методами одномерной и двумерной ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III 400 MHz, Германия) в дейтерированном диметилсульфоксиде (ДМСО-d<sub>6</sub>), а также масс-спектрометрией низкого разрешения на хромато-масс-спектрометре Flexar-15 (Perkin Elmer, США) с масс-спектрометрическим сингл квадрупольным детектором, способ ионизации – электроспрей (ESI) в режиме сканирования SCAN в диапазоне масс 100-400, в положительной и отрицательной ионизации. Прогнозирование фармакологической активности выделенных индивидуальных соединений оценивали с помощью программы PASS.

Компонентный состав гексановой фракции определяли методом ГХ-МС на хроматографе с масс-спектрометрическим детектором «Clarus 600T» («PerkinElmer», США), колонка Elite-5MS, толщина фазы 0,25 мкм размером 30 м × 0,25 мм.

Все используемое оборудование (средства измерения) поверено и квалифицировано, что обеспечивает обязательный элемент прослеживаемости и достоверности полученных данных.



Обработку результатов химического эксперимента осуществляли с применением методов математической статистики в соответствии с рекомендациями ГФ РФ XIV ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента».

### Глава 3. Фитохимическое исследование сырья *Orthilia secunda* L. и растений рода *Rhodiola*

Методом ВЭТСХ в траве ортилии однобокой установлено наличие углеводов, аминокислот, трепеновых соединений, дубильных веществ, 4 органических кислот (аскорбиновая, яблочная, винная, лимонная). Обнаружены флавоноиды (рутин, кемпферол, гиперозид, цинарозид, мирицетин), причем показано, что их состав зависит от региона заготовки сырья. Состав ГКК и ФКК также варьирует в зависимости от места произрастания. В траве ортилии однобокой из всех регионов заготовки было обнаружено присутствие арбутина и галловой кислоты. Корневища и корни 3 видов родиол имеют особенности в фитохимическом составе органических (в т.ч. amino-) кислот, флавоноидов, веществ терпеновой структуры, ГКК, ФКК, а также специфичных фенольных соединений, характерных для растений рода *Rhodiola*. Установленные особенности фитохимического профиля растений позволили задать вектор последующих испытаний и сформулировать критерии стандартизации по показателю «Подлинность».

Впервые в гексановой фракции из сырья р. четырехлепестной методом ГХ-МС обнаружено 22 компонента, 17 из которых были идентифицированы. Соединения с наибольшим накоплением – этиловые эфиры линолевой, олеиновой и пальмитиновой кислот, что характерно для растительных объектов. Из летучих соединений, обуславливающих запах растений, идентифицирован только бензиловый спирт.

Методом ВЭЖХ определено содержание родоспецифичных фенольных соединений в сырье 3 видов родиол. Хроматограмма ВЭЖХ профиля родоспецифичных фенольных соединений 3 изученных видов родиол приведена на рисунке 1. Результаты количественного определения отражены в таблице 1.

Впервые установлено, что производные коричневых спиртов характерны только для р. розовой. Для корневищ и корней р. четырехлепестной характерно превалирование салидрозида и тирозола (0,532% и 0,021% соответственно).

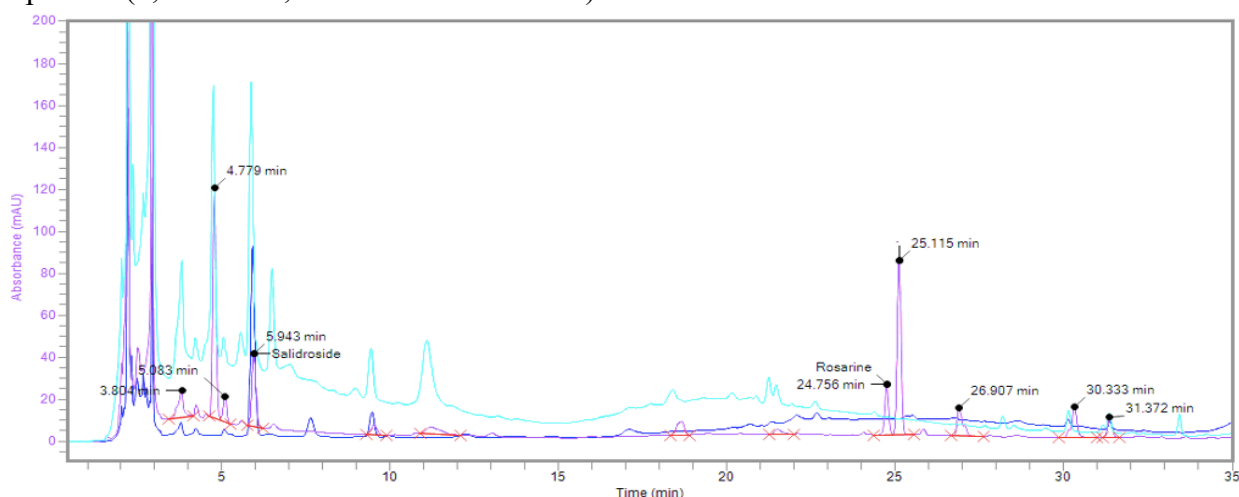


Рисунок 1 – ВЭЖХ профиль родоспецифичных фенольных соединений 3 видов родиол (испытуемый раствор р. розовой - фиолетовый, р. четырехлепестной - синий, р. разнозубчатой - голубой)

Таблица 1 - Содержание фенольных спиртов и их гликозидов в 3 видах родиол

Раствор стандартного образца	70% спиртовые извлечения корневищ с корнями							
	Р. розовая		Р. четырехлепестная (БАД)		Р. четырехлепестная (заготовка)		Р. разнозубчатая	
	$X_{cp} \pm \Delta x_i, \%$	$\varepsilon, \%$	$X_{cp} \pm \Delta x_i, \%$	$\varepsilon, \%$	$X_{cp} \pm \Delta x_i, \%$	$\varepsilon, \%$	$X_{cp} \pm \Delta x_i, \%$	$\varepsilon, \%$
<b>Тирозол</b>	0,092 ± 0,001	2,94	0,210±0,016	1,22	0,021±0,018	0,43	0,440 ±0,010	0,54
<b>Салидрозид</b>	0,059 ± 0,003	0,31	0,162±0,020	0,61	0,532±0,034	0,85	0,236 ±0,001	0,14
<b>Розарин</b>	0,745 ± 0,395	6,76	Не идентифицирован					

Количественное содержание салидрозида и тирозола выбрано в качестве критерия стандартизации корневищ и корней родиолы четырехлепестной и установлены критерии приемлемости – не менее 0,2 % для тирозола и 0,5% для салидрозида.

Методом ВЭЖХ оценено количество фенольных соединений в траве ортилии однобокой разных регионов заготовки. Хроматограмма извлечений из травы ортилии 3 регионов заготовки приведена на рисунке 2.

Установлено отсутствие гидрохинона во всех исследуемых образцах, но предположено наличие его производных. Наибольшее накопление арбутина установлено в траве ортилии, заготовленной на территории Казахстана - 0,021± 0,001%. Таким образом, можно сделать вывод, что арбутин не является мажоритарным компонентом для сырья ортилии однобокой, а, следовательно, не может быть рекомендован в качестве маркерного соединения при ее стандартизации.

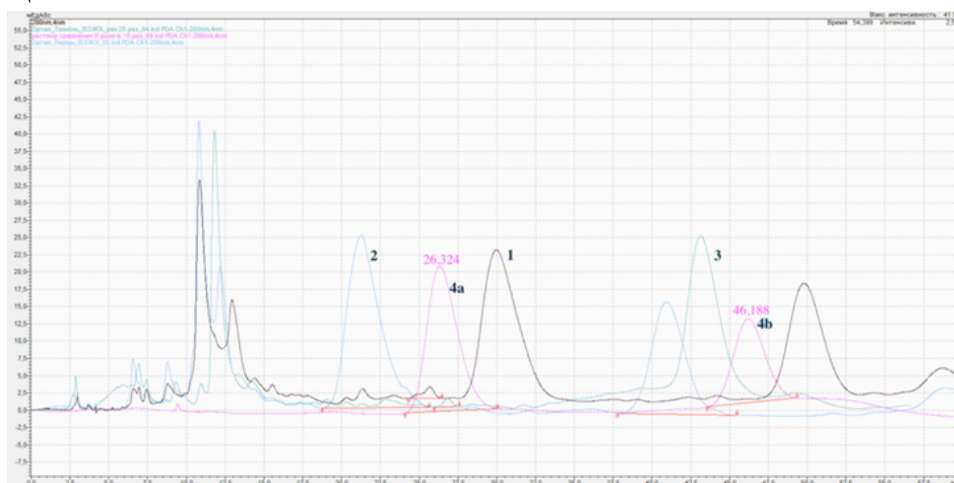


Рисунок 2 - Хроматограмма извлечений из травы ортилии однобокой, заготовки: 1 - Казахстан, 2 - Пермский край, 3 - Тюменская область, 4 - раствор СО (а-арбутин, б-гидрохинон)

Методом УФ-спектрофотометрии установлено содержание ПФС и ГК в траве ортилии однобокой, заготовленной на территории Казахстана. Установлено, что сырье содержит 7,01± 0,2% ПФС и 6,64± 0,15% ГК, таким образом можно позиционировать ГК как основной компонент ПФС и проводить стандартизацию сырья по данному соединению.

Изучен минеральный состав растений-объектов исследования (рисунок 3-4). Впервые в сравнительном аспекте установлены видовые отличия в минеральном профиле растений рода

*Rhodiola*. Среди них родиола четырехлепестная отличается высоким содержанием большинства обнаруженных элементов, что позволяет сделать предположение о высокой концентрации комплексов элементов с БАВ, что влияет на фармакологические эффекты растения. Отмечено высокое содержание марганца в траве ортилии однобокой в сравнении с сырьем 3 видов родиол, которые традиционно относятся к растениям - манганофилам. Данный факт говорит о том, что ортилия однобокая может также служить индикатором почв, богатых солями данного элемента. В ходе исследования установлено, что район заготовки сырья ортилии не влияет на количественное содержание минералов.

Высокое содержание меди, цинка, железа и кальция в сырье ортилии однобокой и родиолы четырехлепестной, может обуславливать их применение в терапии патологий женской репродуктивной системы.

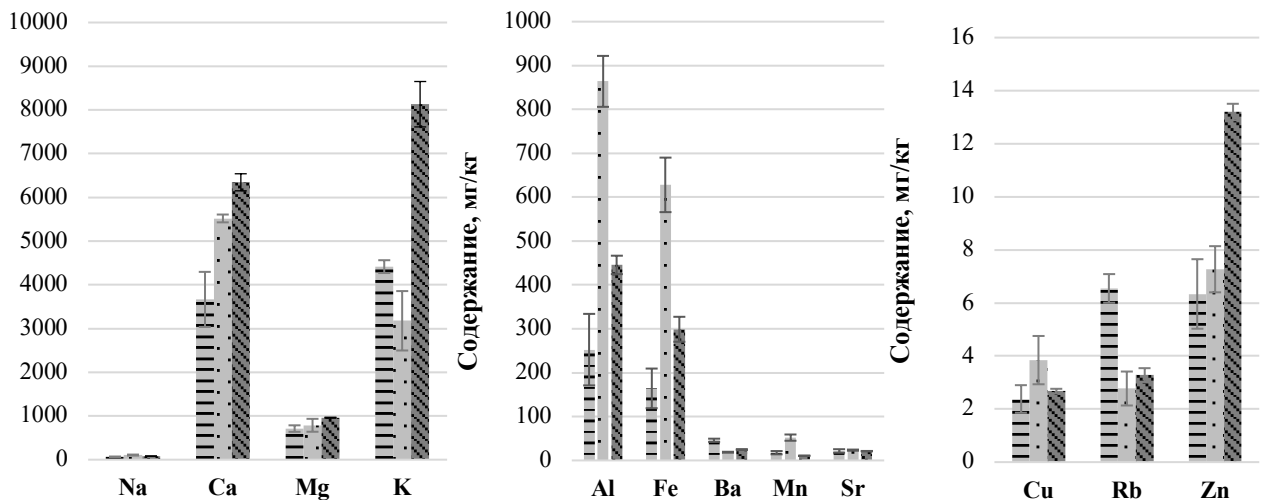


Рисунок 3 – Минеральный состав 3 видов родиол (горизонтальные линии - родиола розовая, точки – родиола четырехлепестная, косые линии – родиола разнозубчатая )

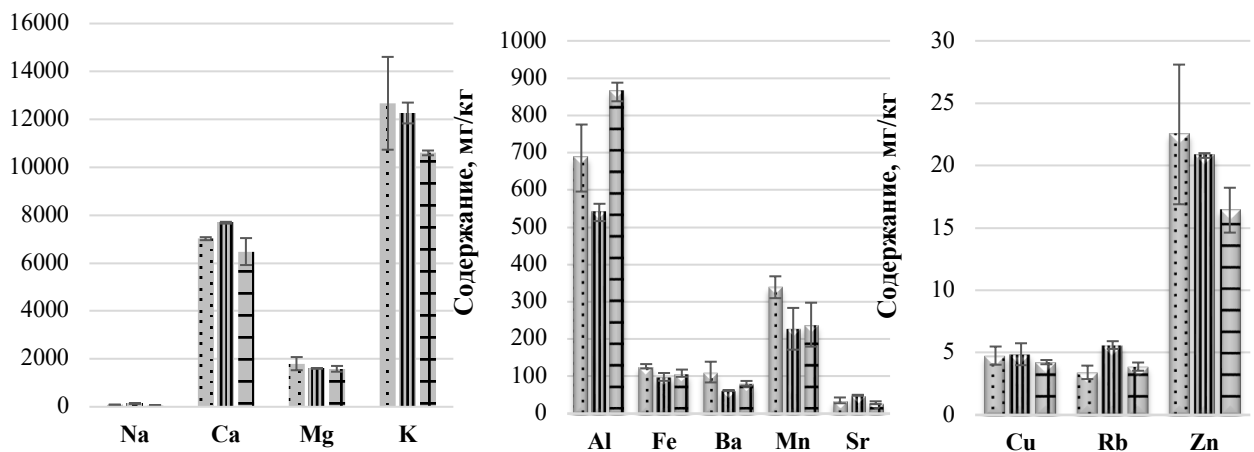


Рисунок 4 - Минеральный состав травы ортилии однобокой из трех регионов заготовки (горизонтальные линии – Тюменская область, вертикальные линии – Пермский край, точки - Казахстан)

В результате комплексного фитохимического изучения выбраны маркерные группы БАВ, которые дают возможность устанавливать критерии стандартизации для сырья ортилии однобокой и родиолы четырехлепестной.

#### Глава 4. Выделение и установление структуры индивидуальных соединений из сырья родиолы четырехлепестной и прогностическая оценка фармакологической активности

Впервые из спиртового извлечения сырья родиолы четырехлепестной методом последовательной жидкость-жидкостной экстракции были получены 4 фракции различной полярности: гексановая (ГФ), этилацетатная (ЭФ), бутанольная (БФ) и водная. Регистрировали хроматографический профиль каждой фракции, отмечали количество пиков веществ и их интенсивность.

Для дальнейшей работы была выбрана ЭФ, так как она оказалась наиболее перспективной. Из нее было получено 9 подфракций, содержащих потенциально индивидуальные соединения, что выражалось в элюировании определенного хроматографического пика, (маркировали RQ1-9 соответственно), которые были использованы для установления структуры веществ. Установление структуры индивидуальных соединений проводили методом –  $^1\text{H}$ -ЯМР и масс-спектроскопии. По результатам  $^1\text{H}$ -ЯМР анализа была определена структура 7 соединений (2 соединения не удалось идентифицировать), которые представлены 3,4 – дигидроксibenзойной кислотой, 4-гидроксibenзойной кислотой, кофейной кислотой, этилгаллатом, катехином, эпикатехином и тирозолом. Структуру выделенных соединений дополнительно подтверждали методом масс-спектрометрии.  $^1\text{H}$ -ЯМР и масс-спектр (демонстрационно) протокатеховой кислоты приведены на рисунке 5.

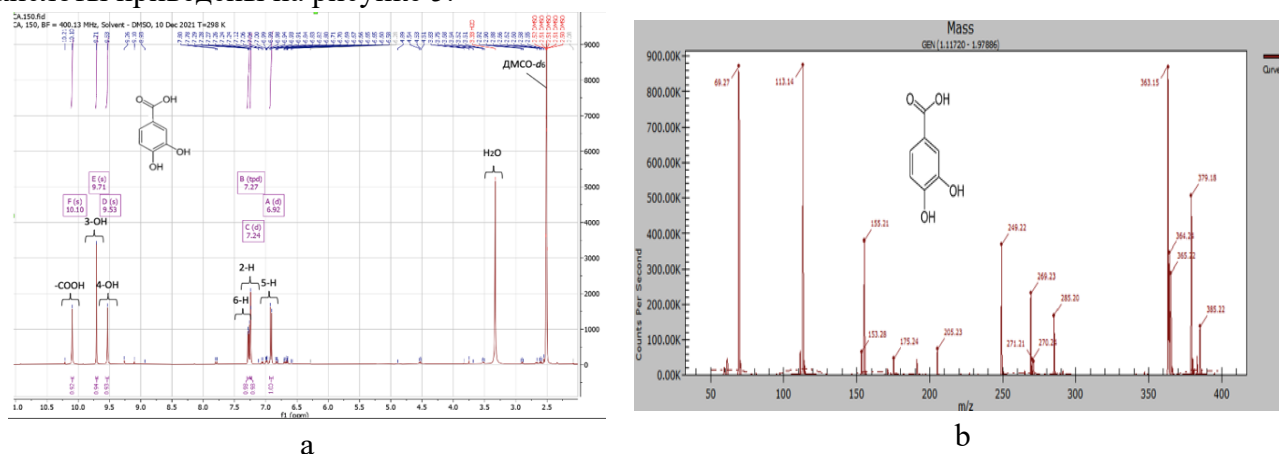
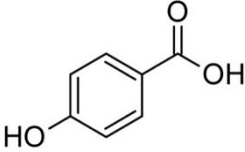
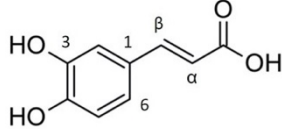
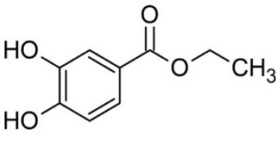
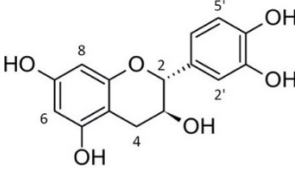
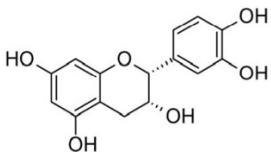


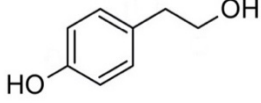
Рисунок 5 -  $^1\text{H}$ -ЯМР (а) и масс-спектр (б) протокатеховой кислоты сырья р. четырехлепестной

Структурные характеристики выделенных соединений приведены в таблице 2.

Таблица 2 - Структурные характеристики выделенных индивидуальных соединений *Rhodiola quadrifida*

№	Структурная формула	Химическое название (тривиальное название)	Характеристические полосы $^1\text{H}$ -ЯМР спектра	Характеристические ионы, $m/z$
1	2	3	4	5
1		3,4-дигидроксibenзойная (протокатеховая) кислота	$\delta\text{H}$ 6.92 (1H, <i>d</i> , $J = 8.0$ Гц, H-5); 7.24 (1H, <i>d</i> , $J = 1.9$ Гц, H-2); 7.27 (1H, <i>dd</i> , $J = 8.0, 1.9$ Гц, H-6); $\delta\text{H}$ 9.53 (1H, <i>s</i> , OH-3); 9.71 (1H, <i>s</i> , OH-4); $\delta\text{H}$ 10.10 (1H, <i>s</i> , COOH)	молекулярный ион $m/z$ 153 в отрицательной ионизации

1	2	3	4	5
2		4-гидроксibenзойная кислота	$\delta$ H 6.83 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.7 Гц, H-3, H-4); 7.79 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.7 Гц, H-2, H-6); $\delta$ H 10.21 (1H, <i>s</i> , OH-4); $\delta$ H 12.38 (1H, <i>s</i> , COOH)	молекулярный ион <i>m/z</i> 137 в отрицательной ионизации
3		3-(3,4-дигидроксифенил) - 2-пропеновая (кофейная) кислота	$\delta$ H 6.76 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.1 Гц, H-5); 7.02 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2.0 Гц, H-2); 6.96 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8.1, 2.0 Гц, H-6); $\delta$ H 6.17 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 15.8 Гц, H- $\beta$ ); 7.41 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 15.8 Гц, H- $\alpha$ ); $\delta$ H 9.12 (1H, <i>s</i> , OH-3); 9.52 (1H, <i>s</i> , OH-4); $\delta$ H 12.11 (1H, <i>brs</i> , COOH)	осколочные ионы <i>m/z</i> 179, 163, 164 в положительной ионизации
4		этил 3,4,5-тригидроксibenзоат (этилгаллат/этиловый эфир галловой кислоты)	$\delta$ H 1.27 (3H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7.1 Гц); 4.21 (2H, <i>q</i> , <i>J</i> = 7.1 Гц); $\delta$ H 6.95 (2H, <i>s</i> , H-2, H-6); $\delta$ H 8.91 (1H, <i>s</i> , OH-4); 9.24 (2H, <i>c</i> , OH-3, OH-5)	осколочный ион <i>m/z</i> 125 в положительной ионизации
5		(2R, 3S) -2-(3',4'-дигидроксифенил) - 3,4-дигидро-2H-хромен-3, 5,7-триол (катехин)	$\delta$ H 2.35 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 16.0, 8.1 Гц, H-4a); 2.66 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 16.0, 5.2 Гц, H-4b); 3.82 (1H, <i>m</i> , H-3); 4.48 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 7.6 Гц, H-2); $\delta$ H 5.90 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2.2 Гц, H-6); 5.69 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2.2 Гц, H-8); $\delta$ H 6.72 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1.8 Гц, H-2'), 6.68 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.0 Гц, H-5'); 6.59 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 8.0, 1.8 Гц, H-6'); $\delta$ H 8.79 (1H, <i>s</i> , OH-3'), 8.84 (1H, <i>s</i> , OH-4'), 8.92 (1H, <i>s</i> , OH-7) и 9.16 (1H, <i>s</i> , OH-5)	осколочный ион <i>m/z</i> 139 в положительной ионизации
6		(2R, 3R) -2-(3',4'-дигидроксифенил) - 3,4-дигидро-2H-хромен-3, 5,7-триол (эпикатехин)	$\delta$ H 2.48 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 16.5, 3.3 Гц, H-4a); 2.66 (1H, <i>dd</i> , <i>J</i> = 16.4, 4.3 Гц, H-4b); 4.01 (1H, <i>m</i> , H-3); 4.74 (1H, <i>uu</i> , S, H-	осколочный ион <i>m/z</i> 139 в положительной ионизации

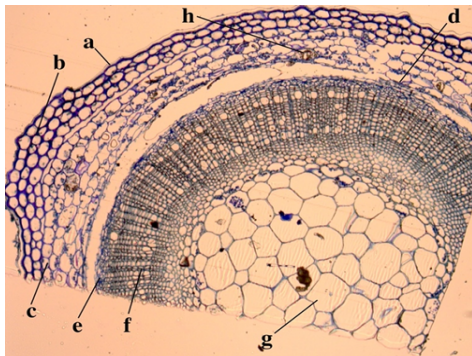
			2); $\delta$ H 5.90 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2.1 Гц, H-6); 5.72 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 2.1 Гц, H-8); $\delta$ H 6.90 (1H, <i>d</i> , <i>J</i> = 1.1 Гц, H-2'); 6.66 (1H, <i>m</i> , H-5'); 6.66 (1H, <i>m</i> , H-6'); $\delta$ H 8.80 (4H, <i>уш.</i> S, OH-3', OH-4', OH-7) и 9.10 (1H, <i>s</i> , OH-5)	
7		4-(2-гидроксиэтил)фенол (тирозол)	$\delta$ H 2.65 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7.3 Гц); 3.56 (2H, <i>t</i> , <i>J</i> = 7.3 Гц); $\delta$ H 6.71 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.3 Гц, H-3, H-4); 7.02 (2H, <i>d</i> , <i>J</i> = 8.3 Гц, H-2, H-6); $\delta$ H 4.56 (1H, <i>уш.</i> <i>s</i> ); 9.13 (1H, <i>уш.</i> <i>c</i> )	осколочный ион <i>m/z</i> 179 в положительной ионизации

Прогностическую оценку фармакологической активности для выделенных соединений проводили с помощью программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances). Определены наиболее перспективные соединения – протокатеховая и 4-гидроксибензойная кислоты - которые показали наибольшее количество эффектов (более 50) при  $Pa-Pi \geq 0,9$ . Установленные фармакологические активности – в частности, способность ингибировать тестостерон 17 $\beta$ -дегидрогеназу (НАДФ+) и хлордекон редуктазу - обуславливают перспективность использования сырья родиолы четырехлепестной для терапии гинекологических патологий, разработки фитопрепаратов на ее основе и дальнейшего подтверждения фармакологической активности в исследованиях *in vivo*.

### Глава 5. Разработка подходов к стандартизации сырья объектов исследования

Глава посвящена разработке критериев стандартизации сырья объектов исследования – травы ортилии однобокой, корневищ и корней родиолы четырехлепестной.

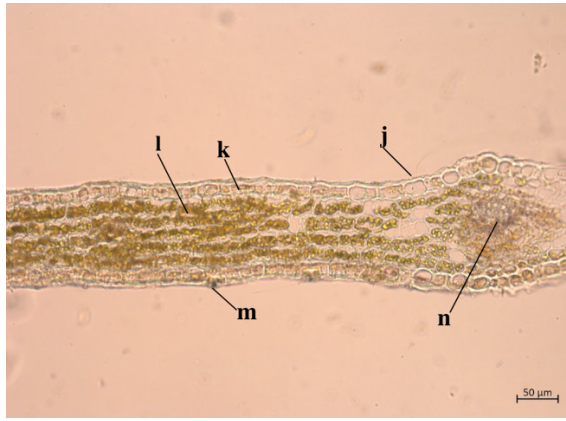
Установлены макро- и микроскопические диагностические признаки изучаемого сырья. Поперечные срезы и препараты с поверхности травы ортилии, корневищ и корней родиолы приведены на рисунках 6-7.



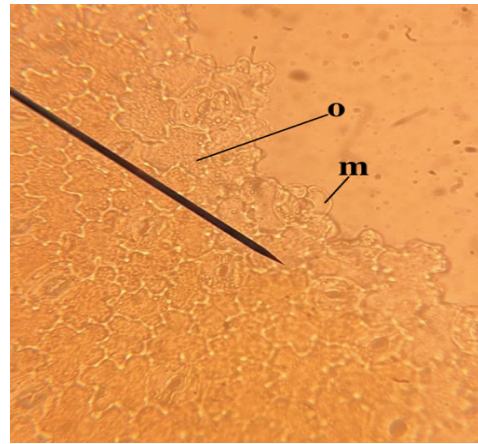
a



b



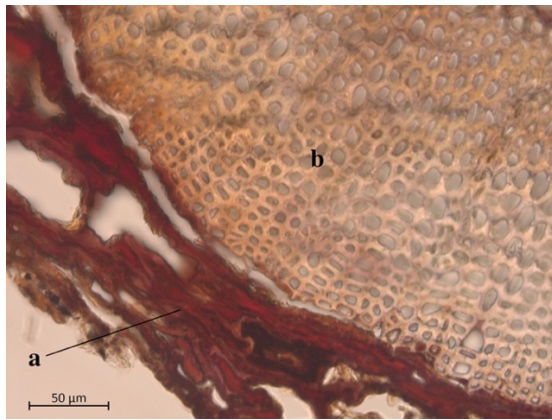
с



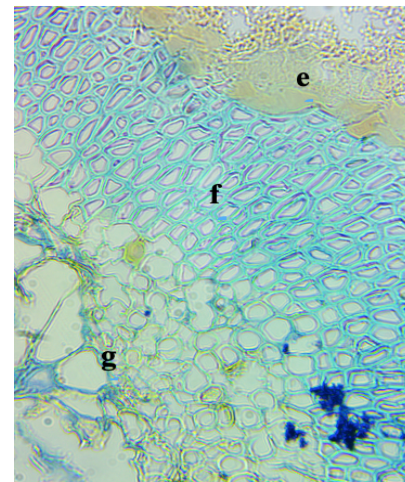
d

Рисунок 6 – Анатомо-диагностические признаки травы ортилии: поперечный срез стебля (a – x 100 и b – x 440): a — эпидерма + кутикула, b — колленхима, c — первичная кора, d — флоэма, e — камбий, f — ксилема, g — клетки сердцевины, h — друзы оксалата кальция, i — крахмальные зёрна; c – поперечный срез листа ортилии однобокой (x20): j — кутикула, k — клетки мезофилла, l — хлоренхима, m — устьице, n — закрытый коллатеральный проводящий пучок; d - препарат листа ортилии однобокой с поверхности нижняя сторона листовой пластинки (x40): o – четковидное утолщение клеточных стенок

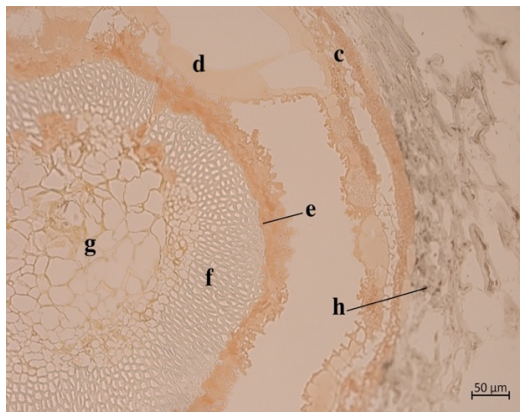
Для ортилии однобокой анатомо-диагностическими признаками являются: клеточные стенки эпидермиса четковидно утолщенные, гипостоматический тип листа, устьичный аппарат аномоцитного типа, в мезофилле нет деления на палисадную и губчатую ткань, стебель непучкового типа строения.



a



b



с

Рисунок 7 – Фрагменты поперечного среза сырья родиолы четырехлепестной: a – корневище (элементы коры x 20); b – корневище после окраски о-толуидином (x 400); c – корневище после окраски суданом III. Примечание: a - наружные клетки пробкового слоя; b – внутренние клетки пробкового слоя; c – паренхима коры; d – флоэма; e – камбий; f – сосуды ксилемы; g – клетки сердцевины; h – зерна крахмала

Для корневищ и корней родиолы четырехлепестной характерны: 2 типа клеток пробки (наружные – уплощенные, окрашены в интенсивно-красный цвет, суберинизированные; внутренние – толстостенные, округлые); корневище непучкового типа; флоэма частично разрушена; линия камбия представлена одним рядом клеток; сосуды ксилемы расположены радиальными рядами; клетки сердцевинны крупные, тонкостенные.

Результаты изучения микроскопических признаков позволили установить, что корневища и корни родиолы четырехлепестной кардинально отличается по типу строения от фармакопейного вида родиолы розовой. Анатомо-диагностические признаки двух видов родиол (в сравнительном аспекте) приведены в таблице 3.

Таблица 3 – Сравнение анатомо-диагностических признаков р. четырехлепестной и розовой

Анатомический элемент	Вид родиолы	
	четырёхлепестная	розовая [ГФ РФ]
Тип строения	непучковый	пучковый
Паренхима коры	присутствует, но значительно разрушена	присутствует, не разрушена
Пробка	многослойная, слоистая. Клетки пробки 2-х типов (вытянутые и округлые), дифференцируются постепенно	многослойная, слоистая. Клетки пробки 1 типа (вытянутые)
Паренхима сердцевинны	в наличии	в наличии. Содержит крахмальные зерна

Данные признаки дают возможность проводить отличие родил двух видов – четырехлепестной и розовой.

Как элемент стандартизации, экспериментально изучены числовые показатели, характерные растительному сырью и установлены их критерии приемлемости: зола общая, зола нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты, влажность, сумма экстрактивных веществ, посторонние примеси, степень измельченности. Для целей дальнейшей разработки ЛРП были установлены технологические параметры сырья объектов исследования.

На основе полученных экспериментальных данных разработано 2 проекта ФС «Ортилии однобокой трава» и «Родиолы четырехлепестной корневища и корни».

## **Глава 6. Разработка и стандартизация фитосубстанции на основе сырья ортилии и родиолы четырехлепестной**

Комплексное фитохимическое изучение и стандартизация травы ортилии однобокой и корневищ и корней родиолы четырехлепестной создали предпосылки для разработки фитокомпозиции (ФК) на их основе с направленным действием для терапии патологий гинекологической сферы. В качестве оптимальной лекарственной формы предложен сбор растительный, поскольку сборы являются препаратами выбора и занимают значительную долю (31%) на рынке фитопрепаратов (Акамова А.В. с соавт., 2017). К тому же сбор даст возможность сохранить многокомпонентность состава БАВ изучаемых объектов и разработать критерии стандартизации с использованием параметров качества исходного сырья, что обеспечивает сквозную стандартизацию, подход, принятый в современной фармацевтической аналитике.

По результатам фитохимического исследования растительных композиций в трех вариантах соотношений видов сырья родиолы четырехлепестной и ортилии однобокой (1:1, 1:2



и 2:1) было определено оптимальное соотношение компонентов – 2:1. Было установлено содержание маркерных компонентов отдельных растений в составе ФК, которое в водном извлечении составило: салидрозида – 0,53%, тирозола – 0,10%, ГК – 4,22%. Хроматограмма водного извлечения сбора в соотношении сырья родиолы – ортилии 2:1 представлена на рисунке 8.

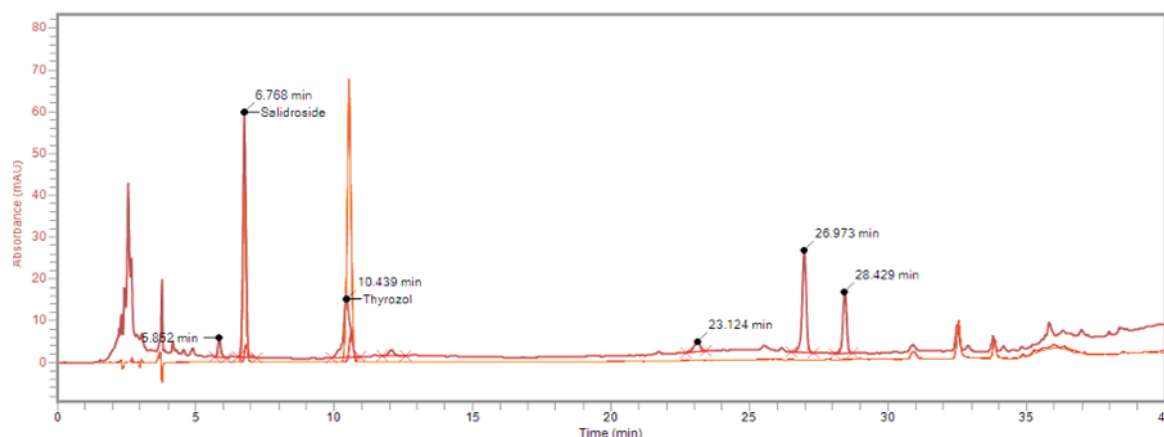


Рисунок 8 - Хроматограмма водного извлечения сбора в соотношении сырья родиолы – ортилии 2:1: оранжевый - смесь растворов СО, красный - испытуемый раствор.

Для количественной оценки ГК в растительном сборе была адаптирована УФ-СФМ методика. Проведены ее валидационные испытания по характеристикам специфичности, прецизионности, линейности, правильности и устойчивости. Специфичность была подтверждена совпадением максимумов УФ-спектров поглощения раствора СО галловой кислоты и водного извлечения сбора в боратном буфере рН 9,0, а также отсутствием поглощения растворителя - боратного буфера. Наблюдалась линейная зависимость в диапазоне концентраций 70-120% с высоким значением коэффициентов корреляции ( $r=0,9980$ ). Результаты относительного стандартного отклонения среднего результата не превышали критериев приемлемости ( $S\bar{x},\% < 2\%$ ). При оценке правильности методики количественного определения ГК процент восстановления находился в пределах 98,2–99,2%. При изучении устойчивости установлена зависимость количественного содержания ГК в водном извлечении от температуры и времени хранения.

Для фитокомпозиции определены числовые показатели, технологические параметры, а также установлены характерные макро- и микроскопические признаки.

Разработан проект НД на растительную композицию «Сбор гинекологический №1». Спецификация проекта НД приведена в таблице 4.

Таблица 4 – Спецификация «Сбор гинекологический №1»

Показатели	Методы	Нормы
1	2	3
Подлинность	ГФ РФ Визуальный	В соответствии с проектом НД
	ГФ РФ Микроскопический визуальный	В соответствии с проектом НД
	ГФ РФ ТСХ	На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться 1 зона адсорбции с флуоресценцией темно-серого цвета при просмотре в УФ-свете 254 нм

1	2	3
	<p><i>-галловая кислота</i></p> <p><i>-салидрозид и тирозол</i></p>	<p>и синего цвета при 366 нм на уровне раствора СО галловой кислоты; допускается наличие других зон адсорбции.</p> <p>На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться два пятна серого цвета на уровне раствора СО салидрозида и тирозола; допускается обнаружение других зон адсорбции.</p>
Посторонние примеси	<p>ГФ РФ</p> <p>Весовой</p> <p><i>Сырье, изменившее окраску (пожелтевшее и почерневшее)</i></p> <p><i>Другие части растения (листья, стебли, в том числе отделяемые при анализе)</i></p> <p><i>Органическая примесь</i></p> <p><i>Минеральная примесь</i></p>	<p>не более 4 %.</p> <p>не более 5 %.</p> <p>не более 1 %.</p> <p>не более 1%.</p>
Влажность	ГФ РФ Гравиметрический	не более 10%.
Зола общая	ГФ РФ Гравиметрический	не более 7%.
Зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте	ГФ РФ Визуальный	не более 4%.
Сумма экстрактивных веществ	ГФ РФ Гравиметрический	не менее 7%
Тяжелые металлы и мышьяк	ГФ-РФ АЭС-ИСП ААС	В соответствии с требованиями ОФС.1.5.3.0009.15
Микробиологическая чистота	ГФ РФ Биологический	Категория 4.А
Радионуклиды	ГФ РФ	В соответствии с требованиями ОФС.1.5.3.0001.15
Остаточные количества пестицидов	ГФ РФ ГХ-МС	В соответствии с требованиями ОФС.1.5.3.0011.15
Количественное определение	ГФ РФ УФ-СФМ	Содержание галловой кислоты в пересчете на абсолютно сухое сырье - не менее 4 %;
	ГФ РФ ВЭЖХ	Содержание салидрозида в пересчете на абсолютно сухое сырье - не менее 0,5%.

1	3
Упаковка	В соответствии с ГОСТ 17768-90. По 50 или 100 г в пакеты бумажные двойные или одинарные
Маркировка	В соответствии с ГОСТ 17768-90. На пачке указывают страну, предприятие-изготовитель, и его товарный знак, название продукции на латинском и русском языках, массу в упаковке при максимально допустимой влажности, способ употребления, условия хранения, регистрационный номер, номер серии, срок годности, штриховой код препарата, соответствие продукции требованиям НД.
Условия хранения	В сухом, защищенном от света месте
Срок годности	2 года

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Критический анализ массива научных данных в отношении степени изученности *Orthilia secunda* L. и *Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. & С.А.Меу., а также данные о количестве БАД на основе сырья этих растений позволил установить отсутствие системного фитохимического профилирования и стандартизации, а с учетом популярности этих видов в этнофармакологии гинекологических патологий, обосновать актуальность и сформулировать дизайн исследования.

1. Проведен системный фитохимический скрининг сырья ортилии и родиолы четырехлепестной. С помощью групповых качественных реакций и хроматографических методов (ТСХ и ВЭТСХ) в сырье ортилии однобокой установлено наличие углеводов, аминокислот, терпеновых соединений, дубильных веществ, 4 органических кислот, 5 флавоноидов, 3 ГКК и 3 ФКК, установлено наличие арбутина. Показано, что накопление указанных соединений вариабельно и зависит от зоны произрастания растения. Максимальным ассортиментом отдельных БАВ отличалась трава ортилии, заготовленная в Пермском крае. В сырье родиолы четырехлепестной установлена 1 органическая кислота, 2 аминокислоты, 3 флавоноида, 7 веществ терпеновой структуры, 3 ГКК, 1 ФКК, а также идентифицированы салидрозид и тирозол - специфичные фенольные соединения, характерные для растений рода *Rhodiola*. Проведенные исследования позволили выбрать маркерные группы БАВ – полифенольные соединения (в т.ч. галловая кислота и арбутин) для ортилии однобокой и родоспецифичные фенольные спирты для родиолы четырехлепестной – для стандартизации объектов исследования.

2. Методом ВЭЖХ изучен профиль и проведена количественная оценка содержания родоспецифичных фенольных соединений в сырье 3 видов родиол в сравнительном аспекте. На основе экспериментальных данных показано, что производные коричных спиртов – розавин, розиридол и др. – являются видоспецифичными и накапливаются только в родиоле розовой. Мажоритарными компонентами для сырья р. четырехлепестной являются салидрозид и тирозол (0,53% и 0,21% соответственно), которые выбраны в качестве маркерных для стандартизации сырья.

3. Изучен макро- и микроэлементный состав растений – объектов исследования. К элементам максимального накопления можно отнести: железо  $127 \pm 6,0$  мг/кг, марганец  $329 \pm 29,0$  мг/кг, цинк  $20,80 \pm 0,2$  мг/кг (для ортилии однобокой); железо  $628,0 \pm 62,0$  мг/кг, медь  $3,8 \pm 0,09$  мг/кг и марганец  $52,0 \pm 7,0$  мг/кг (для родиолы четырехлепестной). Установлено, что место произрастания растений не влияет на качественные и количественные характеристики

элементного профиля. В результате исследования установлены видовые отличия в минеральном профиле растений рода *Rhodiola*. Так, в родиоле четырёхлепестной установлена высокая концентрация натрия и марганца, причем содержание марганца в 3 раза больше, чем в р. розовой, и в 4,9 раз больше, чем в р. разнозубчатой. Отмечено высокое содержание марганца ( $329 \pm 29,0$  мг/кг) в траве ортилии однобокой по сравнению с сырьем 3 видов родиол. Следовательно, ортилия однобокая, наряду с родиолами, относится к манганофилам и может служить индикатором почв, богатых солями данного элемента.

4. Из корневищ и корней *Rhodiola quadrifida* выделены в индивидуальном состоянии и идентифицированы методами ЯМР и масс-спектрометрии 7 компонентов этилацетатной фракции – протокатеховая кислота, 4-гидроксibenзойная кислота, кофейная кислота, этилгаллат, катехин и эпикатехин, тирозол. Данные БАВ являются мажоритарными для сырья родиолы четырёхлепестной, что позволяет использовать их как отдельный элемент стандартизации. Методом ГХ-МС в гексановой фракции сырья родиолы четырёхлепестной установлено наличие 22 соединений, 17 из которых были идентифицированы и оценены количественно методом внутренней нормализации. Максимально представлены эфиры жирных кислот (этиловый эфир пальмитиновой кислоты - 16,9%; этиловый эфир линолевой кислоты – 32,67%; этиловый эфир олеиновой кислоты – 16,9%). Показано отсутствие среди идентифицированных соединений веществ терпеновой природы, что косвенно говорит об отсутствии эфирного масла в родиоле четырёхлепестной или накоплении терпеновых соединений в минимальном количестве, что отличает данный вид сырья от фармакопейного – родиолы розовой. Для выделенных соединений проведена прогностическая оценка фармакологической активности с помощью программы PASS и показана перспективность разработки фитопрепаратов гинекологической направленности ввиду способности мажоритарных соединений ингибировать тестостерон 17 $\beta$ -дегидрогеназу (НАДФ+).

5. На основе проведенных исследований выбраны критерии стандартизации, установлено их нормирование и предложены методики оценки подлинности и доброкачественности травы ортилии однобокой, корневищ и корней родиолы четырёхлепестной. Для родиолы в качестве критерия «Подлинность» предложены макро- и микроскопические диагностические признаки (многорядная слоистая пробка, состоящая из суберинизированных клеток, вытянутых в длину, непучковый тип строения, флоэма частично разрушенная, сердцевина выполнена) и испытания методом ТСХ (идентификация салидрозида и тирозола), установлены числовые показатели (зола общая и зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте, влажность, посторонние примеси, сумма экстрактивных веществ). Количественную оценку качества сырья рекомендовано проводить по содержанию салидрозида – не менее 0,5% и тирозола – не менее 0,2% методом ВЭЖХ.

Для показателя «Подлинность» травы ортилии однобокой предложены макро- и микроскопические диагностические признаки (клеточные стенки эпидермиса четковидно утолщенные, гипостоматический тип листа, устьичный аппарат аномоцитного типа, в мезофилле нет разделения на палисадную и губчатую ткань, стебель непучкового типа строения) и испытания методом ТСХ (идентификация галловой кислоты), также установлены числовые показатели (аналогичны родиоле четырёхлепестной). Качество сырья по показателю «Количественное определение» рекомендовано проводить по содержанию галловой кислоты – не менее 6,0% методом УФ-СФМ.

Для объектов исследования изучены технологические параметры. Установленные критерии качества нашли отражение в проектах фармакопейных статей «Ортилии однобокой трава», «Родиолы четырёхлепестной корневища и корни».

6. Предложен оптимальный состав фитосубстанции (растительного сбора) на основе сырья ортилии однобокой и родиолы четырехлепестной и установлены критерии его стандартизации. Проведена валидационная оценка методики количественного определения ГК методом УФ-СФМ и верификационная оценка (по параметру «специфичность») методики количественного определения салидрозида и тирозола методом ВЭЖХ. Пул экспериментальных данных показал, что предложенные методики дают воспроизводимые и достоверные результаты и могут быть использованы для целей контроля качества растительного сбора. На основе проведенных исследований разработан проект НД «Сбор гинекологический № 1».

**СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Тернинко, И.И. Анализ элементного состава отдельных видов *Sedum (Rhodiola) spp.* и *Orthilia secunda* / И. И. Тернинко, **А. В. Лёзина**, Ю. Э. Генералова, М. А. Романова // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2022. – том 11, №1. – С. 132–139.
2. **Лёзина, А. В.** АНАЛИЗ РОДОСПЕЦИФИЧНЫХ ФЕНОЛЬНЫХ СОЕДИНЕНИЙ РАСТЕНИЙ РОДА *RHODIOLA SPP.* В СРАВНИТЕЛЬНОМ АСПЕКТЕ/ **А. В. Лёзина**, И. И. Тернинко, Ю. Э. Генералова., С.С. Джаборова // Химия растительного сырья. - 2022. - № 3. - С. 187-193.
3. **Лёзина, А. В.** Идентификация и количественное определение арбутина в траве ортилии однобокой (*Orthilia secunda*) / **А. В. Лёзина**, И. И. Тернинко, М. В. Крысько // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2021. – том 10, № 4(1). – С. 122–128.
4. **Лёзина, А. В.** К вопросу о применении фитотерапии в лечении гинекологических заболеваний (обзор литературы) / **А. В. Лёзина**, И. И. Тернинко, Н. А. Снигирева, М. А. Романова // Современные достижения фармацевтической науки и практики – Материалы Международной конференции, посвященной 60-летию фармацевтического факультета учреждения образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» - Витебск: Витебский государственный медицинский университет, 2019. – С. 127–129.
5. **Лёзина, А. В.** О состоянии изучения ортилии однобокой и родиолы четырехлепестной для терапии гинекологических заболеваний. / **А. В. Лёзина**, И. И. Тернинко, Н. А. Снигирева, М. А. Романова // Сборник материалов VII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации» - СПб.: Санкт-Петербургский химико-фармацевтический университет, 2019. – С. 291–294.
6. **Лёзина, А. В.** Предварительный фитохимический скрининг ортилии однобокой и родиолы четырехлепестной / **А. В. Лёзина**, Н. А. Снигирева, М. А. Романова // Сборник материалов X Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2020. – С. 100–101.
7. **Лёзина, А. В.** Показатели доброкачественности растений рода *Rhodiola spp.* в сравнительном аспекте / **А. В. Лёзина**, И. И. Тернинко, М. А. Романова // Современные достижения фармацевтической науки в создании и стандартизации лекарственных средств и диетических добавок, содержащих компоненты природного происхождения» - Материалы III Международной научно- практической интернет-конференции - Харьков, 2021. - С. 123–124.
8. **Лёзина, А. В.** Изучение отдельных классов фенилпропаноидов растений рода *Rhodiola* методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии / **А. В. Лёзина**, М. А. Романова // Сборник материалов XI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2021. – С. 68–73.
9. **Лёзина, А. В.** Изучение отдельных классов фенольных соединений в траве *Orthilia secunda* L. / **А. В. Лёзина**, И. И. Тернинко, М. А. Романова // Международная научная конференция «90 ЛЕТ – ОТ РАСТЕНИЯ ДО ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА: ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ», Сборник материалов юбилейной международной научной конференции - Москва, 2021 - С. 486–492.
10. **Лёзина, А. В.** Получение и предварительный анализ фракций сырья *Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. & С.А.Мей/ **А. В. Лёзина**, И. И. Тернинко, М. А. Романова // «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы». Международная научно-практическая конференция: сборник материалов – Томск: СибГМУ, 2021. – С. 53 -55.

11. **Лёзина, А. В.** Спектрофотометрическое определение суммы полифенольных соединений и галловой кислоты в траве *Orthilia secunda* / **А. В. Лёзина**, И. И. Тернинко, А.А. Толстикова // Сборник материалов XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2022. – С.208-211.

12. **Лёзина, А. В.** Анатомо-морфологическое исследование травы ортилии однобокой / **А. В. Лёзина**, И. И. Тернинко, Г.Л. Кислов, Г.И. Дубенская, Е.В. Бабушкина // Сборник материалов XII Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего» – Санкт-Петербург: СПХФУ, 2022. – С.205-208.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**

АЭС-ИСП - атомно-эмиссионная спектрометрия с индуктивно-связанной плазмой  
БАВ - биологически активные вещества  
БАД - биологически активные добавки  
БИН РАН - Ботанический институт им. В.Л. Комарова Российской академии наук  
БФ – бутанольная фракция  
ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография  
ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография  
ГРЛС – государственный реестр лекарственных средств  
ГКК - гидроксикоричные кислоты  
ГК – галловая кислота  
ГФ – гексановая фракция  
ГФ РФ XIV- Государственная фармакопея Российской Федерации XIV  
ГХ-МС - газовая хроматография—масс-спектрометрия  
ЕФ 10.0 – Европейская фармакопея 10.0 издания  
КО- количественное определение  
ЛР - лекарственное растение  
ЛРС - лекарственное растительное сырье  
НД - нормативная документация  
ОФС – общая фармакопейная статья  
ПФС- полифенольные соединения  
СО - стандартный образец  
ТСХ - тонкослойная хроматография  
УФ - ультрафиолетовое излучение  
УФ-СФМ – спектрофотометрия в ультрафиолетовой области  
ФК - фитокомпозиция  
ФКК - фенолкарбоновая кислота  
ФС – фармакопейная статья  
ЭФ- этилацетатная фракция  
ЯМР – ядерно – магнитный резонанс