

Валов Роман Игоревич

**Фармакогностическое исследование
надземной части
Chamaenerion angustifolium (L.) Scop.**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор фармацевтических наук, профессор

ХАНИНА МИНИСА АБДУЛЛАЕВНА

Официальные оппоненты:

доктор биологических наук, профессор кафедры неорганической и аналитической химии ФГБОУ ВПО «Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления» Минобрнауки России
АНЦУПОВА ТАТЬЯНА ПЕТРОВНА

кандидат фармацевтических наук, старший научный сотрудник лаборатории химико-фармацевтических исследований ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН
ОЛЕННИКОВ ДАНИИЛ НИКОЛАЕВИЧ

Ведущая организация:

ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации

Защита состоится “22” мая 2012 г. в 16⁰⁰ час. на заседании диссертационного совета ДМ 003.028.01 при Институте общей и экспериментальной биологии СО РАН по адресу: ул. Сахьяновой, 6, 670047, г. Улан-Удэ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Бурятского научного центра СО РАН по адресу: ул. Сахьяновой, 6, 670047, г. Улан-Удэ.

Автореферат разослан “20” апреля 2012 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук



ХОБРАКОВА В.Б.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ. Несмотря на значительные успехи, достигнутые в области изучения опухолевого процесса, разработки методов профилактики, диагностики и лечения, проблема злокачественных новообразований является одной из важнейших в современной медицине. Применяемые методы хирургического, лучевого и лекарственного лечения опухолевых заболеваний часто не приводят к полному выздоровлению больных, в связи с чем для здравоохранения актуально изыскание новых высокоэффективных и безопасных средств, методов борьбы с онкологическими заболеваниями (Гольдберг и др., 2008; Горбунова и др., 2003; Иванова и др., 2009).

Перспективным в настоящее время является поиск новых препаратов для лечения и профилактики онкологических заболеваний, а также создание лекарственных препаратов, усиливающих действие цитостатиков и снижающих их токсическое действие. Наиболее часто в схемы лечения онкологических больных включаются цитостатики природного происхождения (винбластин, винкристин, колхамин, подофиллин и др.), обладающие характерными для всех цитостатических препаратов побочными эффектами. Необходимо отметить, что встречается все больше сведений об использовании растительных средств в качестве иммуномодуляторов, повышающих общую резистентность организма и выступающих в качестве средств дополнительной терапии (Бабаскина и др., 1997; Иванов и др., 2001).

Препараты на основе растительных компонентов выгодно отличаются от синтетических лекарственных средств, прежде всего, низкой токсичностью, высокой биодоступностью и меньшим числом побочных эффектов (Гольдберг и др., 2000). В этом отношении перспективным объектом исследования является иван-чай узколистный (*Chamaenerion angustifolium* (L.) Scop., син. *Chamerion angustifolium* (L.) Holub, сем. Onagraceae – Кипрейные), который применяется в традиционной и народной медицине как антиоксидантное, общеукрепляющее, противовоспалительное, ранозаживляющее,

поливитаминозное, противохороадочное средство, а также применяется при бессоннице, головных болях, неврозах, анемии, нарушениях обмена веществ (Растительные ..., 2009). Ранее из соцветий *Ch. angustifolium* был предложен препарат «Ханерол», обладающий высокой противоопухольевой активностью, обусловленной присутствием суммы фенольных соединений (Постольников, 1977). Согласно сведениям научной литературы химический состав надземной части *Ch. angustifolium* изучен недостаточно, также отсутствуют данные о фармакогностическом исследовании данного вида. Таким образом, фармакогностическое изучение надземной части *Ch. angustifolium* является актуальной задачей.

ЦЕЛЮ РАБОТЫ является фармакогностическое исследование надземной части *Ch. angustifolium* и разработка способа получения средства для профилактики осложнений полихимиотерапии.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие **ЗАДАЧИ**:

- определить анатомо-диагностические признаки и товароведческие показатели надземной части *Ch. angustifolium*;
- исследовать химический состав надземной части *Ch. angustifolium*, произрастающего на территории Сибири;
- разработать методы стандартизации надземной части *Ch. angustifolium*;
- разработать способ получения средства для профилактики осложнений полихимиотерапии на основе надземной части *Ch. angustifolium*;
- разработать нормативную документацию на траву иван-чая узколистного и экстракт иван-чая узколистного сухой.

НАУЧНАЯ НОВИЗНА. В надземной части *Ch. angustifolium* впервые установлено присутствие: α -, β -каротинов, ликопина, хлорофиллов а и b, лютеина, зеаксантина, виолаксантина, неоксантина, криптоксантина, кампестерола, стигмастерола, урсоловой кислоты, α -, β -амирина, кумарина, умбеллиферона, скополетина, метилового эфира галловой кислоты, 5-О-кофеилхинной кислоты, мирицетин-3-О-галактозида, свободных флавонолагликонов (кверцетин, кемпферол, мирицетин), дилактона валониевой кислоты

и трех галлоил-глюкоз (6-*O*-галлоил-глюкоза, 1,2,6-*O*-тригаллоилглюкоза и 1,2,3,4,6-*O*-пентагаллоил-глюкоза). Впервые изучен состав антоцианнов цветков *Ch. angustifolium* и установлено присутствие пеонидин-3-*O*-галактозида, цианидин-3-*O*-галактозида, цианидин-3-*O*-глюкозида, цианидин-3,5-*O*-диглюкозида и дельфинидин-3-*O*-глюкозида. Установлено, что доминирующим полисахаридным компонентом надземной части *Ch. angustifolium* является α -4,6-глюкан. С применением метода масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой определено содержание 61 химического элемента, из них 35 впервые. Определены основные анатомо-диагностические признаки надземной части *Ch. angustifolium*. Разработан и предложен способ получения средства для профилактики осложнений полихимиотерапии.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ РАБОТЫ. Разработаны методики количественного определения флавоноидов в пересчете на миквелианин и таннинов в пересчете на энотеин В в надземной части *Ch. angustifolium* с применением дифференциальной спектрофотометрии и твердофазной экстракции – спектрофотометрии. Разработана методика количественного определения 13 фенольных соединений с применением микроколоночной ВЭЖХ. Разработаны проекты Фармакопейных статей предприятия «Трава иван-чая узколистного» и «Экстракт иван-чая узколистного сухой».

СТЕПЕНЬ ВНЕДРЕНИЯ. Теоретические положения и результаты экспериментальных исследований, изложенные в диссертационной работе, используются в учебном процессе кафедры фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО «Новосибирского государственного медицинского университета» Минздравсоцразвития РФ.

НА ЗАЩИТУ ВЫНОСЯТСЯ:

- 1) Результаты химического исследования надземной части *Ch. angustifolium*;
- 2) Данные стандартизации надземной части *Ch. angustifolium*;
- 3) Анатомо-диагностические признаки и товароведческие показатели надземной части *Ch. angustifolium*;
- 4) Способ получения средства для профилактики осложнений

полихимиотерапии на основе надземной части *Ch. angustifolium*.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ. Основные результаты диссертации были доложены и обсуждены на ежегодных конкурсах-конференциях студентов и молодых ученых “Авиценна-2006”, “Авиценна-2007” и “Авиценна-2008” (Новосибирск, 2006, 2007, 2008); XI и XII международных экологических студенческих конференциях “Экология России и сопредельных территорий. Экологический катализ” (Новосибирск, 2006, 2007); 66 и 67 всероссийских итоговых студенческих научных конференциях им. Н.И. Пирогова (Томск, 2007, 2008),

СВЯЗЬ ЗАДАЧ ИССЛЕДОВАНИЯ С ПРОБЛЕМНЫМ ПЛАНОМ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ НАУК. Работа выполнена в соответствии с планом научных исследований кафедры фармакогнозии и ботаники Новосибирского государственного медицинского университета (государственная регистрация № 012000807420) и комплексной целевой программой СО РАМН «Здоровье человека в Сибири» (государственная регистрация № 01.9.2002479).

ПУБЛИКАЦИИ. По результатам диссертационной работы опубликовано 15 научных работ, в том числе 3 статьи – в периодических изданиях, рекомендованных ВАК МОиН РФ.

СТРУКТУРА И ОБЪЕМ ДИССЕРТАЦИИ. Диссертация изложена на 192 печатных страницах, состоит из введения, основной части (6 глав), заключения, списка цитируемой литературы, состоящего из 152 источников, в том числе 70 на иностранных языках, и включает 49 рисунков, 73 таблиц и 3 приложения.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. Трава *Ch. angustifolium* была собрана в различных районах НСО, Ярославской области и республике Бурятия в 2006-2011 гг.

ТСХ и ВЭТСХ проводили на пластинах с силикагелем Сорбфил ПТСХ-АФ и ПТСХ-АФ-В (Имид Ltd.), препаративную ТСХ – на пластинах с силикагелем (Имид Ltd.) и целлюлозой (Merck), КХ – на силикагеле 100/400 (Woelm), полиамиде (Sigma), ионообменную хроматографию – на ДЭАЭ-целлюлозе (Whatman), гель-хроматографию – на Sephadex LH-20 (Farmacia), Sephacryl 300-NR (Sigma-Aldrich). Спектрофотометрические исследования проводили на

спектрофотометре СФ-2000 (ОКБ Спектр). Оптическое вращение определяли на поляриметре СМ-3 (Загорский оптико-механический завод). ИК-спектры регистрировали на ИК-Фурье спектрометре ФТ-801 (Симекс). ГХ-МС анализ проводили на хромато-масс-спектрометре 6890N, соединенным с масс-квадрупольным детектором 5973N (Agilent Technologies) с использованием капиллярной колоноки HP-Innowax (Agilent Technologies; 30 м×0.25 мм×0.50 мкм; неподвижная фаза – полиэтиленгликоль). МС-анализ проводили на масс-спектрометре высокого разрешения МАТ 8200 (Finnigan). Спектры ¹H- и ¹³C-ЯМР регистрировали на ЯМР-спектрометре VXR 500S (Varian). ВЭЖХ проводили на микроколоночном жидкостном хроматографе Милихром А-02 (Эконова). Аминокислотный состав определяли методом капиллярного электрофореза с использованием системы капиллярного электрофореза Капель-105 (Люмэкс), элементный состав – на масс-спектрометре с индуктивно связанной плазмой Elan-DRC II (Perkin-Elmer). Механическую активацию сырья проводили в планетарной мельнице, ультразвуковую обработку – в диспергаторе УЗДН-2Т (Укрросприбор), дезинтеграцию сырья – на установке ДЕЗИ 11МЛ 1Ф. Анатомическое исследование и товароведческий анализ проводили согласно требованиям ГФ XI изд. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программ Statistica MS Excel, OriginPro 7.5. Регрессионный анализ проводили с применением пакета программ Advanced Grapher ver. 2.2 (Alentum Software, Inc.).

1. ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ *Chamaenerion angustifolium*

Для химического исследования экстрактивных веществ надземной части *Ch. angustifolium* было проведено фракционирование и хроматографическое разделение спирторастворимых компонентов с применением жидкофазной экстракции, КХ на силикагеле, полиамиде, Сефадексе LH-20, твердофазной экстракции на полиамиде, препаративной ТСХ на силикагеле и целлюлозе. В результате было выделено 31 соединение, а также определен состав

липофильных (жирные кислоты, стерины, фотосинтетические пигменты) и гидрофильных веществ (аминокислоты, свободные углеводы, ди- и трикарбоновые кислоты).

1.1. Липофильные соединения. Для изучения липофильных компонентов травы *Ch. angustifolium* было проведено исследование гексановой фракции, а также фракции общих липидов, выделенной по методу Фолча, с последующими КХ, препаративной ТСХ, ВЭТСХ на силикагеле и анализом с применением спектрофотометрии, ИК-спектроскопии и ГХ-МС. Установлено присутствие нейтральных липидов, гликолипидов, фосфолипидов, жирных кислот, каротиноидов, хлорофиллов, ксантофиллов, стеролов и тритерпеновых соединений (табл.1). Наличие ряда соединений выявлено в *Ch. angustifolium* впервые.

Таблица 1. Состав липофильных компонентов травы *Ch. angustifolium*

Группа соединений (содержание) ^a	Индивидуальные компоненты (содержание) ^b
Общие липиды (8.37%)	нейтральные (65.2), гликолипиды (10.5), фосфолипиды (24.3)
Жирные кислоты (общие липиды)	6:0 (сл.), 8:0 (сл.), 10:0 (сл.), 12:0 (сл.), 14:0 (0.5), 16:0 (20.7), 16:1 ω7 (0.1), 16:1 ω9 (0.2), 18:0 (3.2), 18:1 ω7 (7.9), 18:1 ω9 (0.5), 18:2 ω6 (18.4), 18:3 ω3 (27.0), 20:0 (4.1), 20:1 ω9 (0.5), 22:0 (1.1), 24:0 (3.9), 26:0 (6.7), 28:0 (3.1), 30:0 (1.8)
Каротиноиды	α-каротин [*] , β-каротин [*] , ликопин [*]
Хлорофиллы	хлорофилл а [*] , хлорофилл b [*]
Ксантофиллы	лютеин [*] , зеаксантин [*] , виолаксантин [*] , неоксантин [*] , криптоксантин [*]
Стероиды	β-ситостерин, кампестерол [*] , стигмастерол [*]
Тритерпены	олеаноловая кислота, урсоловая кислота, α-амирин [*] , β-амирин [*]

^a от массы в.с.с.; ^b от массы группы соединений; ^{*} соединения, присутствие которых выявлено впервые.

1.2. Фенольные соединения. Кумарины, выделенные из хлороформной фракции *Ch. angustifolium*, были идентифицированы как кумарин (4), умбеллиферон (5) и скополетин (6); из спиртового раствора этилацетатной фракции при охлаждении выпадает соединение с выходом 0.2% м.в.с.с.,

идентифицированное с эллаговой кислотой (10). Из этилацетатной фракции было выделено два соединения, охарактеризованных как галловая кислота (9) и ее метиловый эфир (метилгаллат, 8), а также два фенолпропаноида – феруловая (11) и кофейная кислоты (12). Присутствие фенолпропаноидов было выявлено в бутанольной фракции; два выделенных соединения были идентифицированы с 3-*O*-кофеилхинной (23) и 5-*O*-кофеилхинной кислотами (24). Компоненты 9 (Hiermann et al., 1998), 10 (Kiss et al., 2004), 11, 12 и 23 (Hiermann et al., 1998) были ранее обнаружены в *Ch. angustifolium*; 4-6, 8 и 24 выявлены в данном виде впервые.

В составе флавоноидов установлено присутствие 13 соединений группы флавонолов, производных кемпферола (7) – афцелин (кемпферол-3-*O*-рамнозид, 14) и кемпферол-3-*O*-глюкуронид (22); кверцетина (13) – кверцитрин (кверцетин-3-*O*-рамнозид, 15), авикулярин (кверцетин-3-*O*-арабинозид, 17), гиперозид (кверцетин-3-*O*-галактозид, 18), изокверцитрин (кверцетин-3-*O*-глюкозид, 19), кверцетин-3-*O*-(6''-галлоил)-галактозид (20) и миквелианин (кверцетин-3-*O*-глюкуронид, 21); мирицетина (27) – мирицитрин (мирицетин-3-*O*-рамнозид, 16) и мирицетин-3-*O*-галактозид (28) (рис.1).

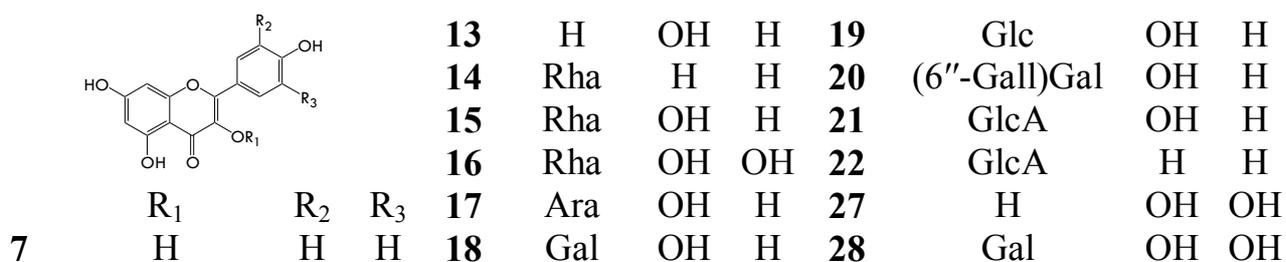


Рис. 1. Структурные формулы флавоноидов травы *Ch. angustifolium*.

Присутствие 14-22 в *Ch. angustifolium* было установлено ранее (Denford, 1980; Ducrey et al., 1995; Hiermann et al., 1991; Kiss et al., 2004; Tóth et al., 2009); соединение 28, а также свободные агликоны 7, 13 и 27 обнаружены впервые.

В результате хроматографического разделения бутанольной фракции было выделено пять соединений, относящихся к классу таннинов, в т.ч. эллаготаннины – дилактон валониевой кислоты (25) и энотеин В (26), и

галлотаннины – 6-*O*-галлоил-глюкоза (**29**), 1,2,6-*O*-тригаллоилглюкоза (**30**) и 1,2,3,4,6-*O*-пентагаллоил-глюкоза (**31**) (рис. 2).

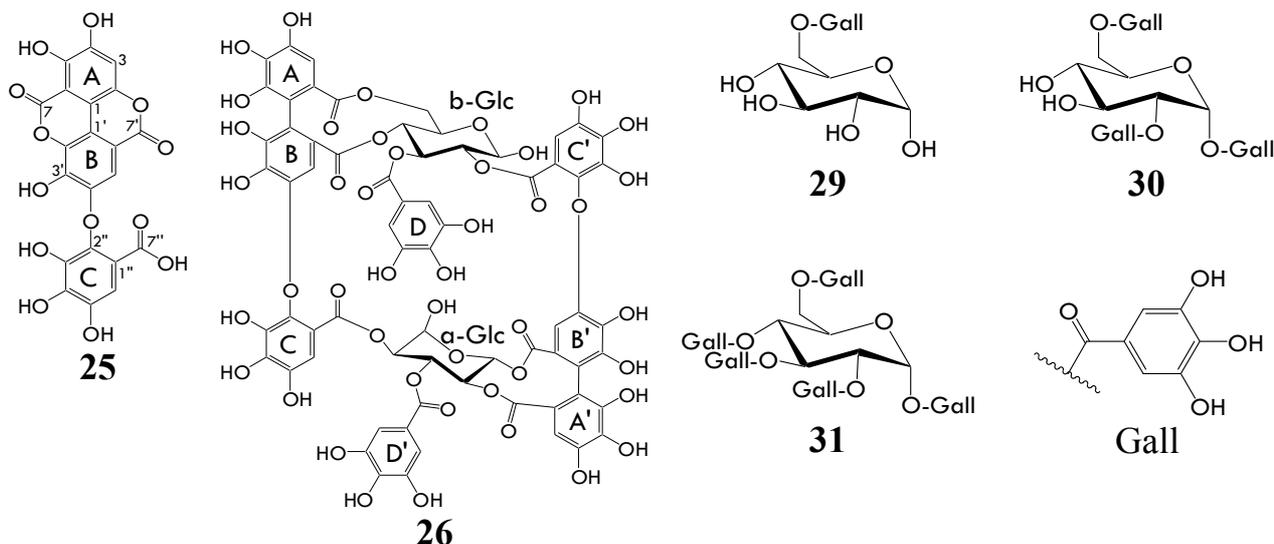


Рис. 2. Структурные формулы таннинов травы *Ch. angustifolium*.

Соединения **25**, **29-31** выделены из *Ch. angustifolium* впервые; ранее присутствие **25**, а также 6-*O*-, 1,6-ди-*O*-, 2,3-ди-*O*- и 1,2,6-три-*O*-галлоилглюкоз было выявлено в *Epilobium hirsutum* (Bakarar et al., 1997).

Учитывая наличие интенсивной пигментации цветков *Ch. angustifolium*, было проведено исследование химического состава антоцианов данного вида. Для их выделения применяли экстракцию 0.1% HCl в этаноле с последующей КХ на Amberlite XAD-7, Сефадексе LH-20, ТСХ на целлюлозе и ВЭТСХ на силикагеле, что привело к выделению 5 соединений, идентифицированных по данным химических превращений, МС-, УФ-, ИК-спектроскопии как пеонидин-3-*O*-галактозид (**32**), цианидин-3-*O*-галактозид (**33**), цианидин-3-*O*-глюкозид (**34**), цианидин-3,5-*O*-диглюкозид (**35**) и дельфинидин-3-*O*-глюкозид (**36**) (рис.3). Соединения **32-36** выделены из *Ch. angustifolium* впервые; ранее исследование антоцианов рода *Chamaenerion* Hill и близкого к нему рода *Epilobium* L. не проводилось.

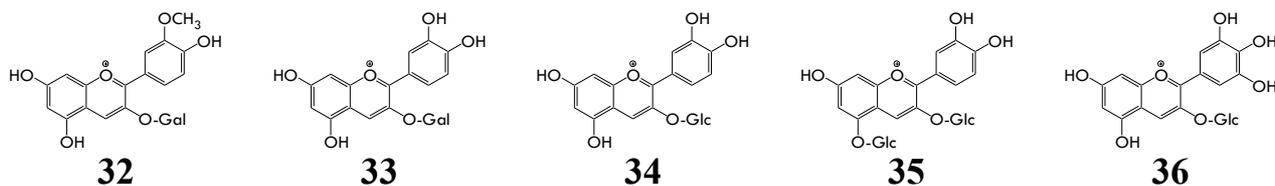


Рис. 3. Структурные формулы антоцианов цветков *Ch. angustifolium*.

Для определения содержания индивидуальных фенольных соединений была разработана методика количественного определения 13 соединений с применением микроколоночной ВЭЖХ с УФ-детектированием (рис.4). Разработанная методика была использована для количественного анализа 11 партий сырья *Ch. angustifolium*, собранного в НСО, Ярославской области и республике Бурятия. Проведенные исследования показали, что для всех исследованных партий сырья доминирующим компонентом является энотеин В, содержание которого составило 51.29-107.79 мг/г. В составе флавоноидов преобладают миквелианин (7.91-26.65 мг/г), афцелин (1.09-18.86 мг/г) и кемпферол-3-*O*-глюкуронид (2.85-12.34 мг/г) (табл. 3).

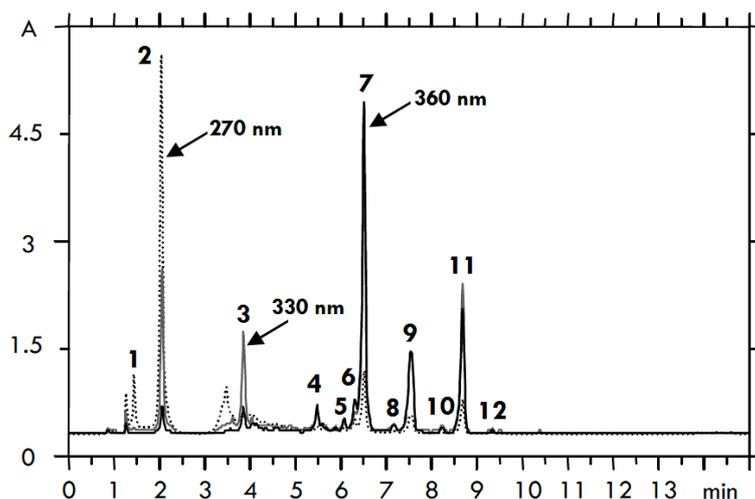


Рис. 4. Хроматограмма (ВЭЖХ) спиртового извлечения травы *Ch. angustifolium*.

Соединения: **1** – галловая кислота, **2** – энотеин В, **3** – 3-*O*-кофеилхинная кислота, **4** – кверцетин-3-*O*-(6''-галлоил)-галактозид, **5** – мирицитрин, **6** – эллаговая кислота, **7** – миквелианин, **8** – кверцитрин, **9** – кемпферол-3-*O*-глюкуронид, **10** – мирицетин, **11** – афцелин, **12** – кверцетин, **13** – кемпферол.

Условия: колонка ProntoSIL-120-5-C18 (2×75 мм, 5 мкм); элюенты А [(4.1 М LiClO₄ в 0.1 М HClO₄):H₂O 5:95], В [MeCN]; градиентный режим 10-40% В (0-12 мин), 100% В (12-15 мин); Т 40°C; ν 200 мкл/мин; детектор 270, 330 и 350 нм.

Таблица 3. Содержание (\bar{x}) фенольных соединений в траве и морфологических группах *Ch. angustifolium*, мг/г м.в.с.с.

Сырье ^а	Соединение ^б												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
НСО													
I	5.55	6.14	55.04	1.37	0.04	1.38	2.85	0.13	1.91	2.30	7.91	0.60	2.07
II	4.98	5.82	106.07	0.90	0.03	9.83	9.13	0.17	1.53	2.08	18.65	0.26	3.19
Ярославская область													
III	6.49	7.58	92.02	1.15	0.07	2.36	4.86	0.16	2.27	3.53	18.72	0.95	2.96
Республика Бурятия													
IV	3.41	5.57	54.84	1.43	0.05	1.09	3.40	0.16	3.87	11.65	9.21	0.58	1.25
V	5.94	8.57	98.66	1.63	0.10	3.67	6.31	0.55	6.19	6.93	26.65	1.17	5.77
VI	3.24	5.77	64.08	1.06	0.04	2.25	3.12	0.16	3.47	11.05	8.92	0.55	2.71
VII	5.07	6.22	51.29	1.05	0.06	2.41	5.42	0.16	3.29	1.79	18.49	0.92	4.33
VIII	8.05	8.39	107.79	1.50	0.04	5.03	4.14	0.20	1.89	3.01	15.52	1.42	2.33
IX	7.15	8.96	73.18	1.24	0.08	18.86	12.34	0.26	4.05	3.52	17.59	3.95	3.57
X	5.76	6.62	105.07	1.57	0.04	5.47	5.27	0.18	1.80	1.65	13.55	1.57	1.91
XI	4.08	5.14	71.77	0.86	0.03	13.28	10.83	0.11	1.43	1.32	10.83	3.16	1.99
Морфологические группы (сырье II)													
листья	7.37	8.82	111.61	1.77	0.10	1.53	5.63	0.45	5.43	7.82	31.62	1.53	5.65
цветки	7.57	9.15	128.61	0.55	0.11	28.85	21.93	0.26	5.84	2.10	11.11	5.18	3.23
стебли	3.42	3.61	54.80	0.41	0.04	0.37	1.79	0.11	1.05	1.04	6.97	0.34	1.25

^а Сырье (фаза цветения): **I** – окр. пос. Мочищи (09.07.2006), **II** – Тогучинский р-он, 45 км от г. Новосибирск (10.07.2009), **III** – окр. п. Карабиха (11.07.2006), **IV** – мыс Тонкий, ю.-з. склон (03.08.2005), **V** – мыс Тонкий, сосновый лес (03.08.2005), **VI** – мыс Тонкий, галечник (03.08.2005), **VII** – мыс Тыя (25.07.2006), **VIII** – окр. пос. Даван (28.07.2006), **IX** – Мухоршибирский р-он, Барской хребет (25.07.2009), **X** – Мухоршибирский р-он, Барской хребет (28.07.2009), **XI** – Заиграевский р-он, окр. пос. Нарын-Ацагат (30.07.2011).

^б Соединения: указаны на рис. 4.

Исследование характера распределения фенольных соединений по морфологическим группам *Ch. angustifolium* показало, что для листьев характерно накопление таннинов (203.86 мг/г), для цветков – флавоноидов (82.58 мг/г) и антоцианов (2.07 мг/г); в стеблях содержание фенольных соединений наименьшее (табл. 4). Следует отметить, что в составе флавоноидов листьев преобладают миквелианин (33.62 мг/г) и кверцетин-3-*O*-(6''-галлоил)-галактозид (7.82 мг/г), цветков – афцелин (28.85 мг/г) и кемпферол-3-*O*-глюкуронид (21.93 мг/г); основными флавоноидами стеблей являются миквелианин (6.97 мг/г) и кемпферол-3-*O*-глюкуронид (1.79 мг/г) (табл. 3).

Таблица 4. Содержание фенольных соединений в морфологических группах *Ch. angustifolium*

Морфологическая группа	Общие фенолы, мг/г ^a	Флавоноиды, мг/г ^b	Таннины, мг/г ^c	Антоцианы, мкг/г ^d
листья	252.46±9.94	43.52±0.87	203.86±3.66	229.84±6.90
цветки	237.86±9.75	82.58±1.65	135.97±2.58	2073.21±66.34
стебли	129.54±5.18	10.74±0.21	64.02±1.15	147.73±4.88

^a в пересчете на галловую кислоту; ^b в пересчете на миквелианин; ^c в пересчете на энотеин В; ^d в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид.

1.3. Углеводы. В составе фракции водорастворимых полисахаридов надземной части *Ch. angustifolium* (CAWP) выявлено присутствие нейтральных и кислых компонентов (табл. 5). Доминирующими являются нейтральные полимеры группы глюканов. Структурные исследования показали, что преобладающий полисахарид *Ch. angustifolium* CAWP-1 представляет собой разветвленный α-4,6-глюкан с молекулярной массой 95 кДа.

Таблица 5. Физико-химическая характеристика полисахаридов *Ch. angustifolium*

Фракция	Выход, %	[α] _D , °	I ₂ -р-ция	Моносахаридный состав, моль%							
				Ara	Gal	Glc	Man	Rha	Xyl	GalA	GlcA
CAWP	3.8*	н.о.	+	9.7	11.3	61.7	4.2	1.9	1.7	9.4	сл.
CAWP-1	54.4**	+127	+	-	-	99.9	-	-	-	-	-

* от массы возд.-сух. сырья; ** от массы CAWP.

1.4. Первичные метаболиты. В составе первичных метаболитов *Ch. angustifolium* было выявлено присутствие аминокислот (19 соединений; доминирует лейцин; суммарное содержание 3.2-3.4%), органических кислот (винная, яблочная, лимонная кислоты; суммарное содержание 2.7-2.9%), аскорбиновой кислоты (15-50 мг%), моносахаридов (сахароза, глюкоза, галактоза).

1.5. Элементный состав. С применением метода масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой установлено присутствие 61 элемента, из них 35 впервые. Выявлено, что для листьев характерно накопление Si, Mn, B, Na, Cr, Mo и Co, для стеблей – Br и Al, для цветков – Fe, Zn, Cu, Se и I. Характер

распределения элементов по группам близок к таковому травы *Ch. angustifolium*.

2. МЕТОДЫ КОНТРОЛЯ КАЧЕСТВА ТРАВЫ *Chamaenerion angustifolium*.

2.1. Методы определения подлинности и количественного анализа травы *Ch. angustifolium*. В качестве критериев подлинности травы *Ch. angustifolium* были выбраны следующие показатели:

1) положительная реакция на антоцианы при подкислении спиртового извлечения;

2) присутствие миквелианина и группы флавоноидов по данным высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ);

3) присутствие энотеина В по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ).

Для проведения количественной оценки действующих веществ травы *Ch. angustifolium* предложено определение содержания двух групп соединений – флавоноидов и таннинов, для которых были разработаны методики количественного анализа.

Для определения содержания флавоноидов использована методика дифференциальной спектрофотометрии после реакции комплексообразования с $AlCl_3$ с рабочей длиной волны 410 нм, являющейся общей для спиртового извлечения *Ch. angustifolium* и доминирующего флавоноида миквелианина (рис. 5a). Учитывая факт отсутствия ГСО миквелианина в России, веществом сравнения был выбран рутин, обладающий сходными спектральными характеристиками, но меньшей интенсивностью экстремума дифференциального спектра. Для устранения данного недостатка при расчетах предложено использование коэффициента пересчета на миквелианин (1.12) в знаменателе формулы. Сравнительные исследования показали, что расхождения в результатах количественного определения флавоноидов в траве *Ch. angustifolium* при использовании в качестве веществ сравнения миквелианина и рутина не превышали 0.1%.

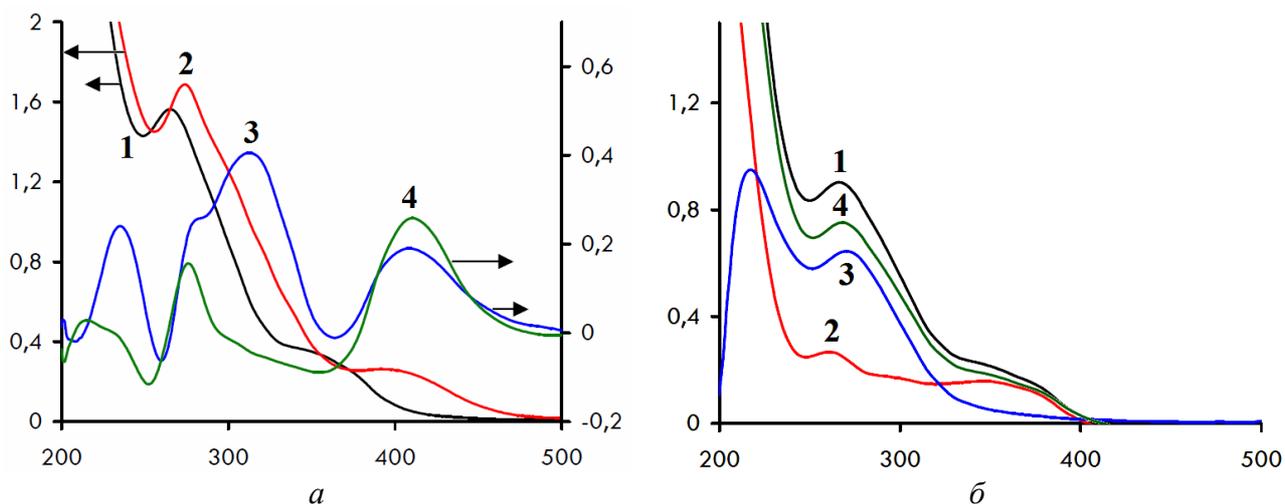


Рис 5. Спектры поглощения спиртового извлечения (СИ) из надземной части *Ch. angustifolium* и веществ сравнения. *а*: **1** – спектр СИ, **2** – спектр СИ в присутствии $AlCl_3$, **3** – дифференциальный спектр СИ, **4** – дифференциальный спектр миквелианина ($c = 8$ мкг/мл). *б*: **1** – спектр СИ, **2** – спектр СИ после ТФЭ, **3** – дифференциальный спектр СИ, **4** – спектр энотеина В ($c = 2$ мкг/мл).

Для количественного анализа таннинов в траве *Ch. angustifolium* была разработана комбинированная методика, включающая этапы экстракции сырья этанолом, твердофазной экстракции (ТФЭ) спиртового извлечения на полиамидном патроне и дифференциальной спектрофотометрии. В процессе ТФЭ происходила необратимая сорбция таннинов на полиамиде, что подтверждалось результатами ВЭЖХ; в элюате после ТФЭ присутствовали только флавоноиды и ряд простых фенольных соединений, степень элюции которых составляла 98-99%. Спектрофотометрический анализ проводили в дифференциальном варианте с использованием в качестве раствора сравнения элюат после ТФЭ, а рабочим являлся исследуемый раствор без обработки, что позволило устранить влияние нетанниновых соединений при образовании спектра поглощения (рис. 5б). Максимум дифференциального спектра (270 нм) был близок к таковому энотеина В (267 нм), который был выбран в качестве вещества сравнения. Для удобства при расчетах использовалось значение удельного коэффициента погашения энотеина В ($E_{1cm}^{1\%} = 345$).

В ходе валидационного анализа при определении специфичности, повторяемости, правильности, межоперационной точности и точности разработанные методики удовлетворяют критериям приемлемости. Общие

метрологические показатели приведены в табл. 8. Суммарное содержание флавоноидов и таннинов в исследованных партиях сырья составило 2.19-5.40 и 5.93-16.82%, соответственно.

Таблица 6. Метрологические характеристики разработанных методик количественного анализа ($n = 10, P = 0.95, t_{p,f} = 2.26$)

Показатель	$\bar{x},\%$	S^2	S	S_x	$\pm \Delta x,\%$	$E,\%$
флавоноиды	5.03	$3.71 \cdot 10^{-2}$	$1.93 \cdot 10^{-1}$	$6.09 \cdot 10^{-2}$	0.14	2.74
таннины	12.33	$2.95 \cdot 10^{-1}$	$5.43 \cdot 10^{-1}$	$1.72 \cdot 10^{-1}$	0.39	3.15

2.2. Анатомо-диагностические признаки и товароведческие показатели травы *Ch. angustifolium*. По данным анатомического исследования установлены следующие диагностические признаки надземной части *Ch. angustifolium*: *лист* гипостоматический, устьица аномоцитные, слегка погруженные. Клетки нижней эпидермы сильно извилистостенные, покрыты толстым слоем складчатой кутикулы. Клетки верхней эпидермы почти прямостенные, могут иметь как тонкие, так и толстые боковые стенки. Паренхима листа выполнена округлыми и лопастными клетками с большими межклетниками. В мезофилле листа, в основном вдоль жилок, встречаются идиобласты с рафидами (рис. 6а) и слизью. Идиобласты намного крупнее паренхимных клеток. Клетки эпидермы *лепестков* венчика мелкие, с сильно извилистыми стенками, устьица многочисленные. В мезофилле лепестков большое количество клеток – идиобластов с рафидами (рис. 6б) и слизью, которые в несколько раз длиннее клеток идиобластов листа. Наружная эпидерма лепестка покрыта многочисленными одноклеточными выростами.

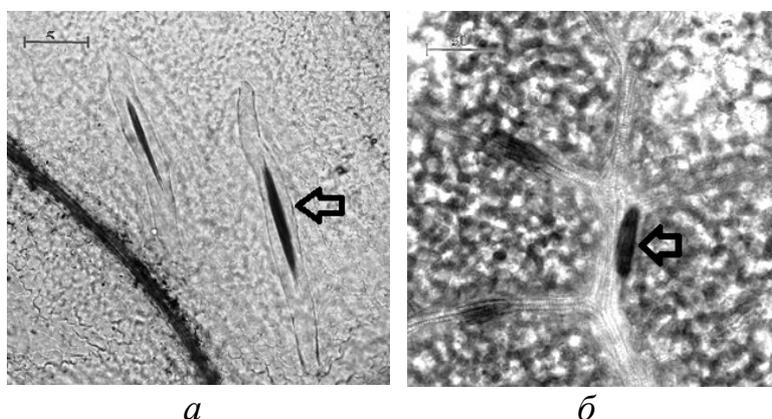


Рис. 6. Фрагменты микроскопического строения листа (а) и лепестка венчика *Ch. angustifolium* (б). Стрелками указано положение рафидов.

Товароведческие показатели надземной части *Ch. angustifolium* представлены в табл. 7.

Таблица 7. Спецификации к ФСП “Иван-чая узколистного трава” и “Экстракт иван-чая узколистного сухой”

Показатели	Методы	Нормы	
		Иван-чая узколистного трава	Экстракт иван-чая узколистного сухой
Описание, внешние признаки	Визуальн., органолепт.	В соответствии с ФСП	В соответствии с ФСП
Подлинность: - антоцианы; - флавоноиды; - энотеин В	Визуальн. ВЭТСХ ВЭЖХ	<p>При подкислении спиртового раствора должно появляться малиновое окрашивание (антоцианы).</p> <p>После проявления в УФ-свете на хроматограмме должны обнаруживаться не менее пяти флуоресцирующих зон, подвижность одной из которых должна совпадать по значению R_f с таковой РСО <i>гиперозида</i>. Между зонами РСО <i>рутина</i> и <i>гиперозида</i> должна присутствовать зона с кирпично-красной флуоресценцией (<i>миквелианин</i>).</p> <p>На хроматограмме должен присутствовать пик со временем выхода ~2 мин между пиками <i>галловой</i> и <i>хлорогеновой</i> кислот (<i>энотеин В</i>).</p>	
Потеря в массе при высушивании	Гравиметрич.	Не более 8%	Не более 5%
Зола общая	Гравиметрич.	Не более 10%	Не более 8%
Сульфатная зола	Гравиметрич.	Не более 0.5%	Не более 0.5%
Тяжелые металлы	ГФ XII	Не более 0.01%	Не более 0.01%
Содержание побуревших листьев	Гравиметрич.	Не более 3%	-
Содержание опушенных частей цветка	Гравиметрич.	Не более 1%	-
Количественное определение: - флавоноиды в пересчете на миквелианин; - таннины в пересчете на энотеин В	Спектро-фотометрич.	Не менее 2%	Не менее 6%
	Спектро-фотометрич.	Не менее 5%	Не менее 15%
Микробиологическая чистота	ГФ XII	Категория ЗБ	Категория ЗБ
Маркировка		В соответствии с ФСП	
Хранение		В защищенном от света месте при температуре 12-15°C	
Срок годности		3 года	5 лет

3. РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ЭКСТРАКТА ИВАН-ЧАЯ УЗКОЛИСТНОГО СУХОГО (ЭИУС)

3.1. Способ получения и химический состав ЭИУС. В результате химико-технологических исследований разработан способ получения средства для профилактики осложнений полихимиотерапии, заключающийся в последовательной экстракции сырья (надземной части *Ch. angustifolium*), измельченного до размера частиц 0.5-3 мм 70% этанолом в соотношении сырье : экстрагент 1:(68-72) в течение 30 мин при 80-82°C трехкратно, с последующим объединением экстрактов, отгоном этанола, упариванием и сушкой в вакуум-сушильном аппарате. Выход готового продукта – 38-40% от массы воздушно-сухого сырья.

Экстракт иван-чая узколистного сухой представляет собой аморфный порошок от желто-коричневого до светло-коричневого цвета со специфическим запахом и вяжущим горьковатым вкусом, хорошо растворимый в 50-70% этаноле. Не гигроскопичен, не комкуется. Насыпная масса при свободной засыпке 0.76 ± 0.02 г/см³, при уплотнении 1.06 ± 0.03 г/см³. Угол естественного откоса $48 \pm 1^\circ$. Сыпучесть 0.91 ± 0.04 г/с. Согласно дериватограмме основное удаление влаги происходит при температуре 60-75°C. При температуре свыше 120°C происходит термическое разложение и карамелизация.

Химический анализ показал, что ЭИУС содержит все основные группы соединений, характерные для исходного сырья (табл. 8).

3.2. Методы контроля качества ЭИУС. Для стандартизации ЭИУС было предложено определение внешнего вида, подлинности (присутствие антоцианов, миквелианина и энотеина В), потери массы при высушивании, золы общей и сульфатной, тяжелых металлов, количественное определение флавоноидов и таннинов и микробиологической чистоты (табл. 7). Суммарное содержание флавоноидов и таннинов в исследованных партиях ЭИУС должно быть не менее 6 и 15%, соответственно.

Таблица 8. Химический состав ЭИУС (серия 150710)

Группа соединений	Общее содержание, мг/г	Индивидуальные соединения (содержание, мг/г)
Простые фенолы	52.21±0.63	галловая кислота (19.26), эллаговая кислота (23.78)
Фенилпропаноиды	-	3- <i>O</i> -кофеилхинная кислота (3.37)
Флавоноиды	85.94±1.71	кемпферол (0.31), афцелин (14.85), кемпферол-3- <i>O</i> -глюкуронид (13.35), кверцетин (0.48), кверцитрин (5.83), кверцетин-3- <i>O</i> -(6''-галлоил)-галактозид (5.22), миквелианин (31.43), мирицетин (3.81), мирицитрин (6.72)
Таннины	351.01±7.02	энотеин В (259.08)

Выводы

1. Определен химический состав надземной части *Ch. angustifolium*. Установлено присутствие: α -, β -каротинов, ликопина, хлорофиллов а и b, лютеина, зеаксантина, виолаксантина, неоксантина, криптоксантина, кампестерола, стигмастерола, урсоловой кислоты, α -, β -амирина, кумарина, умбеллиферона, скополетина, метилового эфира галловой кислоты, 5-*O*-кофеилхинной кислоты, мирицетин-3-*O*-галактозида, свободных флавонол-агликонов (кверцетин, кемпферол, мирицетин), дилактона валониевой кислоты и трех галлоил-глюкоз (6-*O*-галлоил-глюкоза, 1,2,6-*O*-тригаллоилглюкоза и 1,2,3,4,6-*O*-пентагаллоил-глюкоза). Изучен состав антоцианов цветков *Ch. angustifolium* и установлено присутствие пеонидин-3-*O*-галактозида, цианидин-3-*O*-галактозида, цианидин-3-*O*-глюкозида, цианидин-3,5-*O*-диглюкозида и дельфинидин-3-*O*-глюкозида. Установлено, что доминирующим полисахаридным компонентом надземной части *Ch. angustifolium* является α -4,6-глюкан. С применением метода масс-спектрометрии с индуктивно связанной плазмой определено содержание 61 химического элемента, из них 35 впервые.
2. Разработаны методики количественного определения флавоноидов в пересчете на миквелианин и таннинов в пересчете на энотеин В в

надземной части и экстракте сухом *Ch. angustifolium* с применением дифференциальной спектрофотометрии и твердофазной экстракции – спектрофотометрии. Разработана методика количественного анализа 13 фенольных соединений с применением микроколоночной ВЭЖХ.

3. Определены анатомо-диагностические признаки и товароведческие показатели надземной части *Ch. angustifolium*.
4. Разработан способ получения средства для профилактики осложнений полихимиотерапии, заключающийся в последовательной экстракции сырья (надземной части *Ch. angustifolium*), измельченного до размера частиц 0.5-3 мм 70% этанолом в соотношении сырье : экстрагент 1:(68-72) в течение 30 мин при 80-82°C трехкратно, с последующим объединением экстрактов, отгоном этанола, упариванием и сушкой в вакуум-сушильном аппарате. Выход готового продукта – 38-40% от массы воздушно-сухого сырья.
5. Разработаны проекты Фармакопейных статей предприятия «Трава иван-чая узколистного» и «Экстракт иван-чая узколистного сухой».

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Валов Р.И.** Кипрей узколистный – перспективное лекарственное растение / Р.И. Валов // Авиценна-2006: мат-лы ежегодн. конкурс-конф. студентов и молодых ученых.- Новосибирск, 2006.- С. 471-472.
2. **Валов Р.И.** Некоторые результаты фармакогностического исследования *Chamerion angustifolium* (L.) Holub, произрастающего на территории Сибири / Р.И. Валов // Экология России и сопредельных территорий. Экологический катализ: мат-лы XI международн. экологич. студ. конф.- Новосибирск, 2006.- С. 145-146.
3. **Валов Р.И.** Некоторые результаты фармакогностического исследования *Chamerion angustifolium* (L.) Holub / Р.И. Валов // Мат-лы 66 всерос. итог. студ. научн. конф. им. Н.И. Пирогова.- Томск, 2007.- С. 221-222.
4. **Валов Р.И.** Сравнительный анализ основных биологически активных веществ надземной части *Chamerion angustifolium* (L.) Holub / Р.И. Валов

// Авиценна-2007: мат-лы ежегодн. конкурс-конф. студентов и молодых ученых.- Новосибирск, 2007.- С. 451-452.

5. **Валов Р.И.** Некоторые результаты фармакогностического исследования надземной части *Chamerion angustifolium* (L.) Holub / Р.И. Валов, М.А. Ханина // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. научн. тр.- Пятигорск, 2007.- Вып. 62.- С. 77.
6. Ханина М.А. Перспективные лекарственные растения Флоры Сибири / М.А. Ханина, М.Г. Ханина, **Р.И. Валов**, М.Ю. Кудряшова // Химия, технология и медицинские аспекты природных соединений: мат-лы II международн. научн. конф.- Алматы, 2007.- С. 214.
7. **Валов Р.И.** Некоторые результаты фармакогностического анализа надземной части *Chamerion angustifolium* (L.) Holub / Р.И. Валов // Экология России и сопредельных территорий. Экологический катализ: мат-лы XII международн. экологич. студ. конф.- Новосибирск, 2007.- С. 163-164.
8. **Валов Р.И.** Исследования фенольного комплекса надземной части *Chamerion angustifolium* (L.) Holub, произрастающего на территории Сибири / Р.И. Валов // Мат-лы 67 всерос. итог. студ. научн. конф. им. Н.И. Пирогова.- Томск, 2008.- С. 213-217.
9. **Валов Р.И.** Товароведческий анализ *Chamerion angustifolium* (L.) Holub / Р.И. Валов // Авиценна-2008: мат-лы ежегодн. конкурс-конф. студентов и молодых ученых.- Новосибирск, 2008.- С. 385-386.
10. **Валов Р.И.** Некоторые исследования фенольного комплекса надземной части *Chamerion angustifolium* (L.) Holub, произрастающего на территории Сибири / Р.И. Валов, М.А. Ханина // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сб. научн. тр.- Пятигорск, 2008.- Вып. 63.- С. 267-268.
11. **Валов Р.И.** Фармакогностическое исследование надземной части *Chamerion angustifolium* (L.) Holub флоры Сибири / Р.И. Валов, М.А. Ханина //

Вестник Пермской государственной фармацевтической академии.- 2008.- № 4.- С. 296-298.

12. **Валов Р.И.** Полисахариды надземной части *Chamerion angustifolium* (L.) Holub. / Р.И. Валов, М.А. Ханина // Вестник Пермской государственной фармацевтической академии.- 2010.- № 7.- С. 34-37.
13. **Валов Р.И.** Сорбция природных биологически активных веществ на наноалмазах / Р.И. Валов, И.С. Ларионова, М.Г. Ханина, А.П. Родин, М.А. Ханина // Фармация.- 2010.- № 6.- С. 28-31.
14. **Валов Р.И.** Элементный состав травы и экстракта хамериона узколистного / Р.И. Валов, М.А. Ханина, А.П. Родин // Фармация.- 2010.- № 8.- С. 6-8.
15. **Валов Р.И.** Элементный состав *Chamerion angustifolium* (L.) Holub / Р.И. Валов, М.А. Ханина, А.П. Родин // Сибирское медицинское обозрение.- 2010.- № 5.- С. 44-45.

ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ АББРЕВИАТУРЫ. ВЭЖХ – высокоэффективная хроматография, ВЭТСХ – высокоэффективная тонкослойная хроматография, ГСО – государственный стандартный образец, ГХ-МС – газовая хроматография – масс-спектрометрия, ИК – инфракрасный, КХ – колоночная хроматография, НСО – Новосибирская область, ТСХ – тонкослойная хроматография, ТФЭ – твердофазная экстракция, УФ – ультрафиолетовый, ЭИУС – экстракт иван-чая узколистного сухой.