На правах рукописи

СОКОЛОВА ЯНА ВАДИМОВНА

ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ ПУСТЫРНИКА УМЕНЬШЕННОГО (*LEONURUS DEMINUTUS* V.I. KRECZ.) ТРАВЫ И РАЗРАБОТКА НА ЕЕ ОСНОВЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

3.4.2 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Улан-Удэ – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Мирович Вера Михайловна – доктор фармацевтических наук, профессор

Официальные оппоненты:

Лубсандоржиева Пунцык-Нима Базыровна – доктор фармацевтических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей и экспериментальной биологии» Сибирского отделения Российской академии наук / лаборатория медико-биологических исследований, научный сотрудник

Рандалова Туяна Эрдэмовна – кандидат фармацевтических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова» Министерства науки и высшего образования РФ / лаборатория химии природных систем медицинского института, заведующий

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»

Защита состоится «05» апреля 2024 г. в 17.00 часов на заседании диссертационного совета 99.0.045.03 при ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН по адресу: 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Бурятского научного центра СО РАН и на сайте ИОЭБ СО РАН: http://igeb.ru

Автореферат разослан «30» января 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук, доцент В.Б. Хобракова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Одной из важных задач развития фармацевтической отрасли на ближайшие годы согласно утвержденным государственным программам Российской Федерации «О Стратегии развития здравоохранения в РФ на период до 2025 года», «Фарма-2030» является формирование лекарственной безопасности, заключающейся в обеспечении потребителей отечественными лекарственными препаратами в полном объеме.

Перспективным направлением поиска новых лекарственных средств растительного происхождения является изучение близкородственных растений к фармакопейным видам (Крупина М.А., 1994; Петухова С.А., 2018; Чирикова Н.К., 2018).

Быстрые темпы развития цифровизации, повсеместное внедрение высокотехнологичных процессов, значительное увеличение объема информации способствуют повышению тревожности, быстрой утомляемости, раздражительности, развитию бессонницы, апатии и депрессии у современного человека (Robinson L., 1990, Buysse D.J., 2008; Jackson M., 2014). Кроме того, на эмоциональное состояние людей влияет угроза перед новыми инфекционными заболеваниями, такими как COVID-19 (Ayyala R.S., 2020). Перечисленные факторы указывают на востребованность лекарственных средств седативного профиля, особое место среди которых занимают фитопрепараты. Предпочтение в выборе растительных препаратов обусловлено возможностью минимизировать побочные эффекты при длительном использовании, а также же широкой вариабельностью их дополнительного терапевтического действия (Самбукова Т.В. и др., 2017).

Представители рода *Leonurus* L. нашли применение в научной медицине. Виды *Leonurus cardiaca* L. и *Leonurus quinquelobatus* L. входят в Европейскую и Российскую фармакопеи, лекарственные средства на их основе применяют при повышенной нервной возбудимости, сердечно-сосудистых нарушениях, расстройствах сна. В Юго-Восточной Азии (Вьетнам, Китай) фармакопейным является вид *Leonurus japonicus* Houtt., отличающийся химическим составом от европейских представителей и применяемый преимущественно при гинекологических заболеваниях и родовспоможении (Wojtyniak K., 2013; Shang X., 2014; Zhang R.-H. et al., 2018; Звездина Е.В. и др., 2020).

Другие виды рода *Leonurus* используются только в народной медицине (Крупина М.А., 1994; Sermukhamedova O., 2017; Чирикова Н.К., 2018). Так *Leonurus deminutus* V.I. Krecz. – пустырник уменьшенный произрастает на территории Сибири, имеет достаточную сырьевую базу, применяется в народной медицине при слабом пульсе, одышке, испуге, заболеваниях крови (Данилова Н.С., 2010; Banzragchgarav O., 2021). Химический состав *L. deminutus* исследован не в полной мере, известно о содержании в надземных органах флавоноидов и фенилпропаноидов (Olennikov D.N., 2016; Чирикова Н.К., 2018). Для введения в медицинскую практику нового растительного сырья необходимо проведение разработки нормативной документации (НД), для чего нужны полные сведения об его химическом составе, макро- и

микроскопических признаках. Таким образом, проведение комплексного фармакогностического исследования *L. deminutus* является актуальным.

Степень разработанности темы исследования. Изучению химического состава фармакопейных видов рода *Leonurus* посвящены работы отечественных и зарубежных авторов. Отмечается содержание в составе биологически активных веществ (БАВ) флавоноидов (генкванин, космосиин, лютеолин, кверцетин и др.), фенилпропаноидов (хлорогеновая, кофейная кислоты и др.), оксибензойных кислот, иридоидов (Пулатова Т.П., 1972; Wojtyniak K., 2013; Жогова А.А. и др., 2014; Zhang R.-H. et al., 2018). Исследование компонентов эфирного масла проводились Зиэп Т.Т.Н., 2008; Wojtyniak K., 2013, тритерпеноиды изучали Зиэп Т.Т.Н., 2008; Popescu M.-L., 2009; Shang X., 2014; Sermukhamedova O., 2017. Фармакологические исследования показали, что седативное, кардиопротективное действие у *L. cardiaca* определяют иридоиды и флавоноиды (Wojtyniak K., 2013; Zhang R.-H. et al., 2018, Звездина Е.В. и др., 2020), воздействие на женскую репродуктивную систему у *L. japonicus* обуславливают алкалоиды (леонурин, стахидрин) (Kong Y.C., 1974; Li X. et al., 2013; Zhang R.-H. et al., 2018). Стандартизация сырья «Пустырника трава» по Государственной фармакопее (ГФ) РФ XIV издания проводится по содержанию суммы флавоноидов (в пересчете на рутин). В ГФ Республики Беларусь на этот же вид сырья введены показатели «содержание суммы флавоноидов в пересчете на гиперозид» и «содержание суммы иридоидов в пересчете на гарпагида ацетат».

Сведения литературы о *L. deminutus* немногочисленные. Чириковой Н.К. и Оленниковым Д.Н. был установлен качественный состав и содержание фенилпропаноидов надземных органов *L. deminutus*, произрастающего на территории Республики Саха (Olennikov D.N., 2016; Чирикова Н.К., 2018). Монгольскими и японскими учеными определена высокая противомалярийная активность экстракта из цветков и листьев *L. deminutus* в отношении *Plasmodium falciparum* 3D7 (Banzragchgarav O., 2021).

Лекарственные препараты седативного действия являются востребованными, поэтому перспективно изучение и введение в научную медицину растения *L. deminutus.*

Цель работы. Фитохимическое исследование *L. deminutus* травы, стандартизация сырья и разработка на его основе экстракта сухого.

Для реализации цели были поставлены следующие **задачи**:

1. Изучить состав БАВ надземной части *L. deminutus*, выделить и идентифицировать фенольные соединения, иридоиды; изучить продукты гидродистилляции, жирные кислоты, макро-, микро- и ультрамикроэлементы.

2. Определить количественное содержание БАВ в надземной части *L. deminutus*, изучить органспецифическое распределение флавоноидов, фенилпропаноидов и иридоидов, закономерность их накопления с учетом вегетационного периода растения.

3. Изучить макро- и микроскопические признаки *L. deminutus* травы и определить диагностические признаки сырья. Изучить ресурсный потенциал *L. deminutus* в южных районах Иркутской области.

4. Разработать методики качественного и количественного определения основных групп БАВ *L. deminutus* травы, валидировать методики количественного анализа, установить показатели качества и сроки годности сырья, разработать проект фармакопейной статьи (ФС) на сырье *L. deminutus* травы.

5. Разработать технологию экстракта сухого из *L. deminutus* травы, провести его стандартизацию, разработать проект фармакопейной статьи предприятия (ФСП).

Научная новизна. Впервые проведен комплексный анализ нового лекарственного растительного сырья (ЛРС) – *L. deminutus* травы. В ходе фитохимического исследования в надземных органах *L. deminutus* установлено наличие иридоидов, флавоноидов, дубильных веществ, сапонинов, полисахаридов, кумаринов, алкалоидов, аминокислот, аскорбиновой кислоты.

Из надземной части *L. deminutus* впервые выделены и идентифицированы 4 иридоида (гарпагид, изомер аюгола, 8-ацетилгарпагид и аюгозид). Идентифицировано 20 фенольных соединений, из них впервые для вида 6 флавоноидов (рутин, астрагалозид, апигенин-5-*O*-глюкозид, цинарозид, никотифлорин, изокверцитрин), 5 фенилпропаноидов (4-*O*-кофеил-хинная кислота, 5-*O*-кофеил-хинная кислота, изомер кофеил-яблочной кислоты, леонозид А, леонозид В).

Изучен компонентный состав продуктов гидродистилляции, идентифицированы 16 соединений, среди них 6 сесквитерпенов (кариофиллен, α-кубебен, β-ионон и др.), тритерпеновое соединение – лупеол, эфиры карбоновых кислот.

Исследован жирнокислотный профиль надземной части *L. deminutus*, идентифицировано 14 жирных кислот, из них 8 насыщенных жирных кислот и 6 соединений из группы ненасыщенных кислот. Отмечается высокая концентрация в сумме жирных кислот линолевой кислоты (42,03%), *α*-линоленовой кислоты (11,96%) и олеиновой кислоты (11,82%).

В ходе исследования впервые определен элементный состав надземной части *L. deminutus*, установлено 9 макро-, 63 микро- и ультрамикроэлементов.

Определено количественное содержание в надземных органах *L. deminutus* иридоидов, флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, дубильных веществ, сапонинов, полисахаридов, аскорбиновой кислоты и аминокислот.

Изучено органспецифическое распределение фенольных соединений и иридоидов в *L. deminutus*. Наибольшим разнообразием и количественным содержанием данных БАВ отличаются листья и цветки *L. deminutus*.

Наибольшее содержание в надземных органах *L. deminutus* суммы иридоидов и суммы флавоноидов наблюдается в фазу цветения, которая рекомендована для заготовки сырья. В качестве сырья предложена верхняя часть растения – олиственные цветущие побеги длиной до 40 см.

Определены основные диагностические макро- и микроскопические признаки цельного, измельченного и порошкованного сырья *L. deminutus.* Разработаны методики качественного и количественного определения суммы

иридоидов и суммы флавоноидов, валидация методик количественного анализа показала их пригодность.

Разработана технология экстракта сухого из *L. deminutus* травы. Изучен его химический состав, установлены показатели качества, определен срок годности.

Получен патент РФ – «Способ получения растительного средства, обладающего седативным, гипотензивным и антиоксидантным действием» (№ 2792361 от 21.03.2023 г.).

Теоретическая и практическая значимость. Исследования, проведенные в рамках диссертационной работы, позволяют расширить сведения о химическом составе БАВ растений рода *Leonurus*, а именно, *L. deminutus*.

Разработан проект ФС «Пустырника уменьшенного трава – *Leonuri deminuti herba*», «Инструкция по сбору и сушке травы пустырника уменьшенного», проект ФСП «Пустырника уменьшенного экстракт сухой – *Leonuri deminuti extractum siccum*».

Результаты диссертационного исследования используются в учебном процессе ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России на кафедре фармакогнозии и фармацевтической технологии на дисциплинах «Фармакогнозия», «Анализ растительного сырья и сборов», на кафедре фармацевтической и токсикологической химии на дисциплине «Физико-химические методы анализа лекарственных средств»:

– анатомо-диагностические признаки, товароведческие показатели сырья пустырника уменьшенного травы;

– результаты разработки определения подлинности и количественного определения суммы флавоноидов в экстракте сухом пустырника уменьшенного;

– результаты разработки и валидации методик количественного определения суммы иридоидов и суммы флавоноидов в траве пустырника уменьшенного.

Методология и методы исследования. Методология диссертационной работы включает анализ источников литературы зарубежных и российских авторов в области фитохимического, фармакогностического и фармакологического изучения растений рода *Leonurus*. В результате чего сформулирована цель и определены задачи исследования.

Для изучения компонентного состава БАВ, их количественного содержания использованы методы ТСХ, БХ, ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ/МС, ГХ/МС, УФ, ИК-спектроскопия. Для определения анатомо-диагностических признаков сырья *L. deminutus* использовали методы микроскопического и гистохимического анализа ЛРС.

На защиту выносятся:

– химический профиль БАВ травы *L. deminutus* флоры Прибайкалья, закономерности накопления БАВ по органам растения и в зависимости от фазы вегетации;

– основные диагностические макро- и микроскопические признаки *L. deminutus* травы;

– стандартизация сырья *L. deminutus* и разработка проекта ФС «Пустырника уменьшенного трава – *Leonuri deminuti herba*»;

– технология получения экстракта сухого из *L. deminutus* травы, его стандартизация и разработка проекта ФСП.

Личное участие автора. Автором проведен анализ данных литературы по изучаемой тематике, структурирована полученная информация в виде обзора литературы. Определена цель и поставлены задачи исследования, сформулирован план реализации диссертационной работы. Автор принимал ведущее участие в выполнении экспериментальной части диссертации, проводил обработку полученных результатов и их интерпретацию. Диссертант подготовил проекты ФС на сырье и ФСП на экстракт сухой.

Исследование состава иридоидов, флавоноидов, фенилпропаноидов методом ВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС было проведено на базе ФГБУН «Института общей и экспериментальной биологии СО РАН» под руководством ведущего научного сотрудника, д.фарм.н. Оленникова Д.Н.

Апробация полученных результатов. По результатам материалов диссертационной работы основные положения были обсуждены и доложены: на «IV Дальневосточном медицинском молодежном форуме с международным участием» (Владивосток, 2020 г.); на Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки» (Ярославль, 2020 г.); на Байкальской научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины» (Иркутск, 2020 г.); на Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновационные технологии в фармации» (Иркутск, 2020, 2021 гг.); на Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Природные соединения и здоровье человека» (Иркутск, 2020, 2022, 2023 гг.).

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Выполнение диссертационной работы было проведено в соответствии с утвержденным тематическим планом научных исследований, осуществляемых в ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава РФ, по комплексной теме «Изучение перспективных лекарственных растений Восточной Сибири» (№ государственной регистрации 01.2.00304320).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Основные научные положения, изложенные в диссертации, соответствуют паспорту специальности 3.4.2 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки) по пунктам: 2, 3, 6.

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 12 научных работ, из них 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа изложена на 206 страницах машинописного текста и состоит из введения, пяти глав, общих выводов и приложений. Работа содержит 33 рисунка и 48 таблиц. Список цитируемой литературы включает 199 источников, из них 124 – на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектом исследования являлись надземные органы *L. deminutus*, заготовленные в период 2018–2021 гг. на территории Иркутской области (Усть-Ордынского Бурятского округа, Усольского района, окрестностей г. Иркутска). При сборе сырья учитывали фазу развития *L. deminutus* (бутонизация, цветение, плодоношение) для дальнейшего изучения оптимальных сроков заготовки ЛРС.

Макро- и микроскопический анализ образцов надземной части (листья, цветки, стебли) *L. deminutus* проводили в соответствии с указаниями ОФС ГФ XIV издания. Микропрепараты исследовали с использованием микроскопа «Levenhuk D870T» (Levenhuk, США) при увеличении ×40, ×80, ×100, ×120, ×300. Фотографии были сделаны встроенной камерой «Levenhuk C800 NG 8M, USB 2.0». Для их обработки использовали специализированную программу «Levenhuk ToupView (Levenhuk Image Editor) 3.7». Количественные показатели анатомо-диагностических признаков надземной части *L. deminutus* определяли с помощью окуляр-микрометра.

Наличие БАВ в надземной части *L. deminutus* определяли общепринятыми методиками с использованием качественных аналитических реакций, ТСХ на пластинках Sorbfil ПТСХ-П-А и ПТСХ-П-А-УФ (ИМИД, Россия) разных размеров 10×5, 10×10 и 10×15. Качественное обнаружение флавоноидов проводили методом ВЭЖХ на приборе Shimadzu LC-10Avp с УФ-детектором (Shimadzu, Япония). Выделение индивидуальных веществ осуществляли методом колоночной хроматографии, в качестве сорбента применяли полиамид марки Woelm (Германия). УФ-спектры для выделенных соединений регистрировали на приборе СФ-2000 (ОКБ Спектр, Россия), ИК-спектры на приборе Spectrum One FT-IR (PerkinElmer Inc., США).

Изучение состава фенольных соединений и иридоидов надземных органов *L. deminutus* проводили методом ВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС на приборе «LCMS-8050» (Shimadzu, Япония) с диодно-матричным детектором 3q-ИЭР/МС и колонкой GLC Mastro C18 (Shimadzu, Япония).

Анализ элементного состава осуществляли методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на масс-спектрометре «Agilent 7500 ce» (Agilent Technologies, США).

Исследование компонентного состава продуктов перегонки с водяным паром проводили методом ГХ/МС на приборе Agilent 7890A с детектором 7000D (QQQ) и колонкой HP-5MS (Agilent Technologies, США). Методом ГХ/МС исследовали состав жирных кислот на оборудовании Agilent 6890N с масс-спектрометром 5973N и колонкой HP-INNOWAX (Agilent Technologies, США).

Количественное определение БАВ проводили с использованием методов спектрофотометрии (иридоиды, флавоноиды, дубильные вещества, сапонины, аминокислоты, фенолкарбоновые кислоты), титриметрии (дубильные вещества, аскорбиновая кислота, органические кислоты), гравиметрии (полисахариды).

Индикаторы, растворители, реактивы готовили в соответствии с требованиями ГФ XIV издания. В работе использовали стандартные вещества марок Sigma-Aldrich (США), ChemFaces (Китай), ООО «Фитопанацея» (Россия), MedKoo (США), Extrasynthese (Франция).

Для обработки результатов исследований использовали статистические методы согласно указаниям ОФС.1.1.0013.15 «Статистическая обработка результатов химического эксперимента» ГФ XIV издания. Анализ полученных данных осуществляли в программе «Excel 2019» (версия для Windows 8) с применением параметрического критерия «t» Стьюдента.

Валидационную оценку разработанных методик количественного определения проводили согласно ОФС.1.1.0012.15 «Валидация аналитических методик» ГФ XIV издания.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Фитохимическое изучение надземных органов *Leonurus deminutus* V.I. Krecz. флоры Прибайкалья

В результате исследования химического состава надземной части *L. deminutus* с использованием аналитических реакций и ТСХ установили наличие в исследуемом сырье иридоидов, флавоноидов, дубильных веществ, сапонинов, полисахаридов, кумаринов, алкалоидов, аминокислот, аскорбиновой кислоты.

Методом ВЭЖХ-УФ в продуктах кислотного гидролиза спиртового извлечения из *L. deminutus* идентифицировали агликоны флавоноидов лютеолин, кверцетин, апигенин и кемпферол, которые лежат в основе флавоноидов *L. deminutus* (рис. 1). В водно-спиртовом извлечении *L. deminutus* идентифицировали рутин и цинарозид.

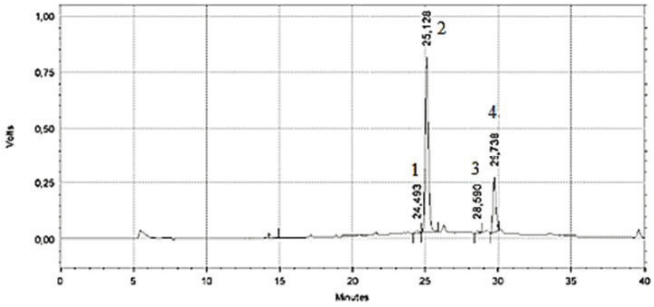

Рисунок 1 – Хроматограмма (ВЭЖХ-УФ, 360 нм) продуктов кислотного гидролиза надземной части *L. deminutus*: 1 – лютеолин, 2 – кверцетин, 3 – апигенин, 4 – кемпферол

Далее нами проведено выделение иридоидов и флавоноидов методом колоночной хроматографии (рис. 2).

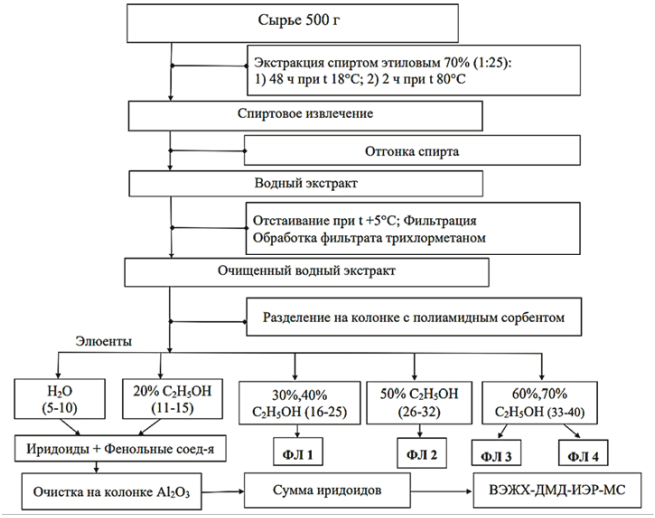

Рисунок 2 – Схема выделения иридоидов и флавоноидов из надземных органов *L. deminutus*

Сумму иридоидов, полученную на колонке при элюировании водой и 20% спиртом этиловым, идентифицировали с помощью ТСХ и ВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС. Из 6 обнаруженных соединений четыре иридоида идентифицированы как гарпагид, изомер аюгола, 8-ацетилгарпагид и аюгозид (табл. 1).

Таблица 1 – Хроматографическая подвижность, данные УФ- и масс-спектрометрии иридоидов *L. deminutus*

№ п/п	Соединение	t, мин	λ_{max}, нм	ИЭР-МС, *m/z*	Уровень идентификации
1	Гарпагид	3,34	210	363 $[M+H]^+$, 385 $[M+Na]^+$	1
2	Изомер аюгола	3,71	210	349 $[M+H]^+$, 371 $[M+Na]^+$	2
3	8-Ацетилгарпагид	3,98	210	407 $[M+H]^+$, 429 $[M+Na]^+$	1
4	Не идентифицировано	5,14	210	389 $[M+H]^+$, 411 $[M+Na]^+$	2
5	Аюгозид	7,21	210	391 $[M+H]^+$, 413 $[M+Na]^+$	1
6	Не идентифицировано	8,14	210	359 $[M+H]^+$, 381 $[M+Na]^+$	2

Примечание. Уровни идентификации: (1) соединение идентифицировано после сравнения данных УФ и масс-спектров, времени удерживания со стандартом; (2) соединения идентифицированы путем сравнения данных УФ и масс-спектров с данными литературы.

При элюировании колонки 30–90% спиртом этиловым из соответствующих фракций (рис. 2), после рехроматографии и перекристаллизации выделили 4 флавоноида, которые идентифицировали как кверцетин-3-*O*-*β*-*D*-рамноглюкозид (рутин), кемпферол-3-*O*-*β*-*D*-глюкозид (астрагалозид), апигенин-5-*O*-*β*-D-глюкозид, лютеолин-7-*O*-*β*-D-глюкозид (цинарозид) (табл. 2).

Таблица 2 – Свойства флавоноидов *L. deminutus*, выделенных методом колоночной хроматографии

№ п/п	Наименование	Формула, Т пл., ºС	Описание	Электронный спектр	
				УФ, нм	ИК, $см^{-1}$
1	Кверцетин-3-*O*-*β*-*D*-рамноглюкозид (рутин)	$C_{27}H_{30}O_{16}$ 195–198	Кристаллы желтого цвета	λ_{max}, нм = 258, $267_{пл}$, 360. (+C_2H_5ONa): 270, 268, 408; (+$AlCl_3$): 274, 300, 409; (+$AlCl_3$+HCl): 268, 298, 403; (+CH_3COONa): 276, 375; (+CH_3COONa+H_3BO_3): 260, 280, 377	3595, 3400 (OH); 1660 (>C=O); 1605, 1575, 1510 (Ar); 1085, 1062, 1025, 980, 900 (гликон); 815, 840 (замещение в кольце «В»)
2	Кемпферол-3-*O*-*β*-*D*-глюкозид (астрагалозид)	$C_{21}H_{20}O_{11}$ 178	Кристаллы желтого цвета	λ_{max}, нм = 265, $300_{пл}$, 351. (+C_2H_5ONa): 278, 386; (+$AlCl_3$): 275, 395; (+$AlCl_3$+HCl): 274, 389; (+CH_3COONa): 283, 367; (+CH_3COONa+H_3BO_3): 277, 336	3368 (OH); 1694 (>C=O); 1646, 1602, 1446, 1368 (Ar); 1275, 1160, 1116, 1074, 1038 (гликон); 821 (замещение в кольце «В»)
3	Апигенин-5-*O*-*β*-*D*-глюкозид	$C_{21}H_{20}O_{10}$ 295	Кристаллы желтого цвета	λ_{max} = 253, 290, $320_{пл}$, 332 нм. (+C_2H_5ONa): 253, 290, 380; (+CH_3COONa): 263, 290, 332	3411, 3150 (OH); 1633 (>C=O); 1603, 1570, 1498 (Ar); 1079, 1019, 983, 890 (гликон); 835 (замещение в кольце «В»)
4	Лютеолин-7-*O*-*β*-*D*-глюкозид (цинарозид)	$C_{21}H_{20}O_{11}$ 239–243	Кристаллы светло-желтого цвета	λ_{max} = 254, $268_{пл}$, 354 нм. (+C_2H_5ONa): 272, 268, 406; (+$AlCl_3$): 270, 300, 328, 400; (+CH_3COONa): 269, 284, 350, 408; (+CH_3COONa+H_3BO_3): 258, 280, 388	3448, 3209 (OH); 1653 см (>C=O); 1554, 1529, 1441 см (Ar); 1088, 1030 (гликон); 823 (замещение в кольце «В»)

Исследование состава фенилпропаноидов проводили методом ВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС. По результатам анализа были идентифицированы 14 фенилпропаноидов и дополнительно 4 флавоноида (табл. 3). Из них впервые в траве *L. deminutus* обнаружили 7 соединений – **1**, **6**, **8**, **13–15**, **18**.

Таблица 3 – Результаты исследования фенилпропаноидов и флавоноидов *L. deminutus* методом ВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС

№ в-ва	Соединение	t, мин	λ_{max}, нм	ИЭР-МС, *m*/*z*	УР
1	4-*O*-кофеил-хинная кислота	5,48	328	353 $[M–H]^–$, 191, 179, 173, 135	1а
2	4-*O*-кофеил-глюкаровая кислота	5,71	327	371 $[M–H]^–$, 191, 179	1б
3	3-*O*-кофеил-глюкаровая кислота	6,10	327	371 $[M–H]^–$, 191, 179, 173	1б
4	2-*O*-кофеил-глюкаровая кислота	6,47	327	371 $[M–H]^–$, 191, 179	1б
5	5-*O*-кофеил-глюкаровая кислота	6,64	327	371 $[M–H]^–$, 191, 179, 173	1б
6	5-*O*-кофеил-хинная кислота (хлорогеновая кислота)	8,18	328	353 $[M–H]^–$, 191, 179	1а
7	Кофейная кислота	8,76	329	179 $[M–H]^–$, 135	1а
8	Кофеил-яблочная кислота (изомер 9)	9,77	327	295 $[M–H]^–$, 179, 135	2
9	2-*O*-кофеил-яблочная кислота (фазеоловая кислота)	10,08	327	295 $[M–H]^–$, 179, 135	1б
10	Кверцетин-3-*O*-рутинозид (рутин)	11,48	254, 267, 351	609 $[M–H]^–$, 463 $[(M–H)–Rha]^–$, 301 $[(M–H)–Rha–Glc]^–$	1а
11	Лавандулифолиозид	14,93	332	755 $[M–H]^–$, 623 $[(M–H)–Aara]^–$, 477 $[(M–H)–Ara–Rha]^–$	1а
12	Вербаскозид (актеозид)	15,42	331	623 $[M–H]^–$, 477 $[(M–H)–Rha]^–$	1а
13	Кемпферол-3-*O*-рутинозид (никотифлорин)	15,71	265, 345	593 $[M–H]^–$, 447 $[(M–H)–Rha]^–$, 285 $[(M–H)–Rha–Glc]^–$	1а
14	Кверцетин-3-*O*-глюкозид (изокверцитрин)	16,92	256, 267, 352	463 $[(M–H)]^–$, 301 $[(M–H)–Glc]^–$	1а
15	Леонозид А	17,27	332	769 $[M–H]^–$, 637 $[(M–H)–Ara]^–$, 491 $[(M–H)–Ara–Rha]^–$	1б
16	Лейкоскептозид А	17,67	332	637 $[M–H]^–$, 491 $[(M–H)–Rha]^–$	1б
17	Кемпферол-3-*O*-глюкозид (астрагалозид)	18,09	265, 346	447 $[M–H]^–$, 285 $[(M–H)–Glc]^–$	1а
18	Леонозид В	18,78	331	783 $[M–H]^–$, 651 $[(M–H)–Ara]^–$, 505 $[(M–H)–Ara–Rha]^–$	1б

Примечание. Уровни идентификации (УР): (1) соединение идентифицировано после сравнения данных УФ и масс-спектров, времени удерживания со стандартом (1а), или выделенного ранее соединения (1б); (2) соединения идентифицированы путем сравнения данных УФ и масс-спектров с данными литературы. Аббревиатуры: Ara – арабиноза, Glc – глюкоза, Rha – рамноза.

При исследовании компонентного состава продуктов гидродистилляции методом ГХ/МС идентифицировали в надземной части *L. deminutus* 16 соединений, среди них 6 сесквитерпенов (кариофиллен, α-кубебен, β-ионон и др.), эфиры фенольных кислот, тритерпеновое соединение – лупеол.

Анализ жирнокислотного состава позволил установить в надземной части *L. deminutus* 14 соединений. Было идентифицировано 8 насыщенных жирных кислот, среди которых преобладает пальмитиновая (18,41%) и стеариновая (4,76%) кислоты. Группа ненасыщенных кислот включает 6 соединений, среди которых наибольшая концентрация линолевой кислоты (42,03%), α-линоленовой кислоты (11,96%) и олеиновой кислоты (11,82%).

При изучении минерального состава в надземной части *L. deminutus* идентифицировали 9 макро-, 63 микро- и ультрамикроэлемента. В составе минерального комплекса отмечается высокое содержание K (42000 мг/кг) и Ca (14500 мг/кг), необходимые для полноценного функционирования нервной, сердечно-сосудистой, опорно-двигательной систем человека. Проведенная оценка безопасности сырья на содержание тяжелых металлов и мышьяка показала соответствие требованиям ГФ XIV издания.

Количественное содержание различных групп БАВ в надземных органах *L. deminutus* представлено в таблице 4.

Таблица 4 – Результаты определения количественного содержания БАВ в надземных органах *L. deminutus*

Группа БАВ	Метод	Содержание, % (в абсолютно сухом сырье)	Метрологические показатели (при n = 6; t(P, f) = 2,57)		
			$S\overline{x}$	$\Delta\overline{x}$	$\overline{E}$,%
Дубильные вещества (в пересчете на танин)	Титриметрия	3,30	0,02108	0,05	1,64
Дубильные вещества (в пересчете на танин)	СФ	2,17	0,00806	0,02	1,15
Флавоноиды (в пересчете на цинарозид)	СФ	1,02	0,01118	0,03	2,82
Фенолкарбоновые кислоты (в пересчете на хлорогеновую кислоту)	СФ	5,05	0,04401	0,11	2,24
Сапонины (в пересчете на олеановую кислоту)	СФ	0,37	0,00372	0,01	2,58
Полисахариды	Гравиметрия	6,48	0,07370	0,19	2,92
Иридоиды (в пересчете на гарпагида ацетат)	СФ	0,91	0,01183	0,03	3,34
Аминокислоты (в пересчете на глутаминовую кислоту)	СФ	3,16	0,01759	0,05	1,43
Аскорбиновая кислота	Титриметрия	52,9мг%	0,42557	1,09	2,07

Суммарное содержание иридоидов составило 0,91±0,03%, флавоноидов – 1,02±0,03%, сапонинов – 0,37±0,01%. Отмечается высокое содержание фенолкарбоновых кислот – 5,05±0,11%, аминокислот – 3,16±0,05%. Содержание суммы дубильных веществ (перманганатометрия) не превышает 3,30%, при спектрофотометрическом анализе – 2,17±0,02%.

Анализ органспецифического распределения фенольных соединений показал, что в листьях и цветках *L. deminutus* накапливается наибольшее количество флавоноидов (7,34 мг/г; 1,33 мг/г соответственно), фенилпропаноидов (40,02 мг/г; 30,3 мг/г соответственно). Суммарное содержание кофеил-глюкаровых кислот в листьях, цветках и стеблях составляет 23,08 мг/г, кофеил-хинных 14,19 мг/г, кофеил-яблочных кислот – 4,74 мг/г (табл. 5).

Таблица 5 – Органспецифическое распределение фенольных соединений в *L. deminutus* траве

№ вещества	Соединение	Содержание, мг/г ± S.D.		
		Листья	Цветки	Стебли
1	4-*O*-кофеил-хинная кислота	0,53±0,02	0,48±0,02	0,08±0,00
2	4-*O*-кофеил-глюкаровая кислота	2,15±0,04	0,53±0,01	–
3	3-*O*-кофеил-глюкаровая кислота	2,33±0,05	0,50±0,01	–
4	2-*O*-кофеил-глюкаровая кислота	1,79±0,03	–	–
5	5-*O*-кофеил-глюкаровая кислота	12,83±0,25	2,79±0,05	0,16±0,00
6	5-*O*-кофеил-хинная кислота	2,57±0,06	9,31±0,21	1,22±0,03
7	Кофейная кислота	0,42±0,01	0,02±0,00	–
8	Кофеил-яблочная кислота (изомер 9)	0,83±0,02	–	–
9	2-*O*-кофеил-яблочная кислота (фазеловая кислота)	3,25±0,07	0,27±0,00	0,39±0,01
10	Кверцетин-3-*O*-рутинозид (рутин)	2,63±0,05	0,35±0,00	–
11	Лавандулифолиозид	8,14±0,17	9,69±0,19	2,27±0,05
12	Вербаскозид (актеозид)	3,22±0,07	4,53±0,09	0,93±0,02
13	Кемпферол-3-*O*-рутинозид (никотифлорин)	0,53±0,01	0,40±0,01	0,07±0,00
14	Кверцетин-3-*O*-глюкозид (изокверцитрин)	0,63±0,01	0,58±0,01	0,05±0,00
15	Леонозид А	1,20±0,02	1,41±0,03	0,23±0,00
16	Лейкоскептозид А	0,43±0,01	0,49±0,02	0,07±0,00
17	Кемпферол-3-*O*-глюкозид (астрагалин)	3,58±0,07	–	0,43±0,01
18	Леонозид В	0,33±0,01	0,28±0,01	–
	Сумма флавоноидов 9,22 мг/г	7,34	1,33	0,55
	Сумма фенилпропаноидов 75,67 мг/г	40,02	30,3	5,35
	кофеил-глюкаровые кислоты 23,08 мг/г	19,1	3,82	0,16
	кофеил-хинные кислоты 14,19 мг/г	3,1	9,79	1,3
	кофеил-яблочные кислоты 4,74 мг/г	4,08	0,27	0,39

Количественное содержание суммы иридоидов и суммы флавоноидов спектрофотометрическим методом показало, что иридоидов в листьях *L. deminutus* содержится 1,15±0,02%, в цветках – 0,48±0,01%, в стеблях – 0,39±0,02%, Содержание суммы флавоноидов в листьях составляет 1,28±0,02%, в цветках – 0,61±0,02%, в стеблях – 0,31±0,01% (рис. 3).

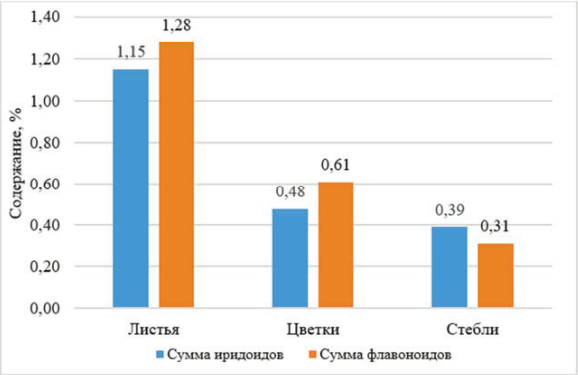

Рисунок 3 – Количественное содержание суммы иридоидов и суммы флавоноидов в надземных органах *L. deminutus*

При изучении содержания суммы иридоидов и суммы флавоноидов в надземной части *L. deminutus* в течение вегетационного периода было установлено, что максимальное содержание БАВ в сырье отмечается в период цветения (рис. 4).

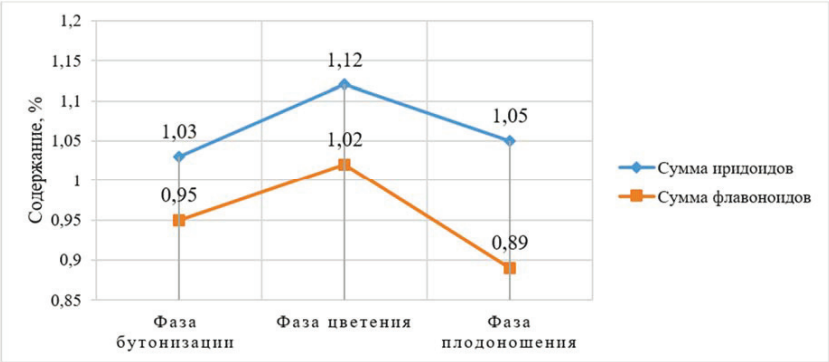

Рисунок 4 – Количественное содержание суммы иридоидов и суммы флавоноидов в надземных органах *L. deminutus* в зависимости от фазы вегетации

В связи с незначительным содержанием БАВ в стеблях рекомендуется проводить заготовку сырья в период цветения в виде олиственной верхней части растения *L. deminutus* с длиной стебля до 40 см.

Стандартизация и разработка нормативной документации на сырье «Пустырника уменьшенного трава»

Для разработки показателей подлинности сырья *L. deminutus* травы провели макро- и микроскопический анализ цельного, измельченного сырья и порошка.

Цельное сырье. Верхушки стеблей длиной до 40 см с листьями и соцветиями. Стебли четырехгранные, умеренно ветвистые, полые, опушены по всей поверхности (особенно по ребрам), толщиной до 0,7 см. Листья супротивные. Нижние листья со слабосердцевидным или прямым основанием, пальчаторассеченные с пятью узкими ромбическими сегментами. Верхние листья – пальчаторассечённые с тремя ланцентными долями. Листовые пластинки цельнокрайние или зубчатые, покрыты коротким опушением. Цветки собраны в недлинные мутовки. Чашечка ширококоническая, коротко прижато-волосистая. Верхние и нижние зубцы с широко-треугольным основанием. Венчик двугубый, верхняя губа беловолосистая с наружной стороны. Цвет стеблей красновато-коричневый, листьев – темно-зеленый, чашечка у основания светло-зеленая, в месте появления зубцов темно-зеленая, венчик розово-фиолетовый. Запах сырья слабый, характерный. Вкус водного извлечения – горьковатый.

Измельченное сырье. Фрагменты стеблей четырехгранной формы, цельные или расщепленные, опушенные, красновато-коричневатые, фрагменты листьев – опушенные, темно-зеленые; фрагменты цветков – чашечка ширококоническая, опушенная, с темно-зелеными зубцами, у основания светло-зеленая, венчик двугубый, розовато-фиолетовый, верхняя губа с наружной стороны – беловолосистая. Запах сырья слабый, характерный. Вкус водного извлечения – горьковатый.

Порошок. Частицы опушенного стебля, красновато-коричневые или беловатые (образованные при расщеплении стеблей); частицы листьев – опушенные, темно-зеленые; частицы цветков – фрагменты чашечки темно- и светло-зеленые, фрагменты венчика розовато-фиолетовые. Цвет порошка серовато-зеленый, имеются белые, розово-фиолетовые, красновато-коричневые вкрапления. Запах сырья слабый, характерный. Вкус водного извлечения – горьковатый.

При микроскопическом исследовании надземных органов *L. deminutus* определены анатомо-диагностические признаки. *Цельное и измельченное сырье*: клетки эпидермиса листьев и цветков с характерными слабо- и сильноизвилистыми стенками; 4-х клеточные железистые волоски повсеместно; на чашелистиках головчатые волоски с овальной головкой; на лепестках многоклеточные кроющие трихомы со спадающимися клетками; наличие друз в структурах венчика; округлая пыльца с бороздкой посередине (рис. 5).

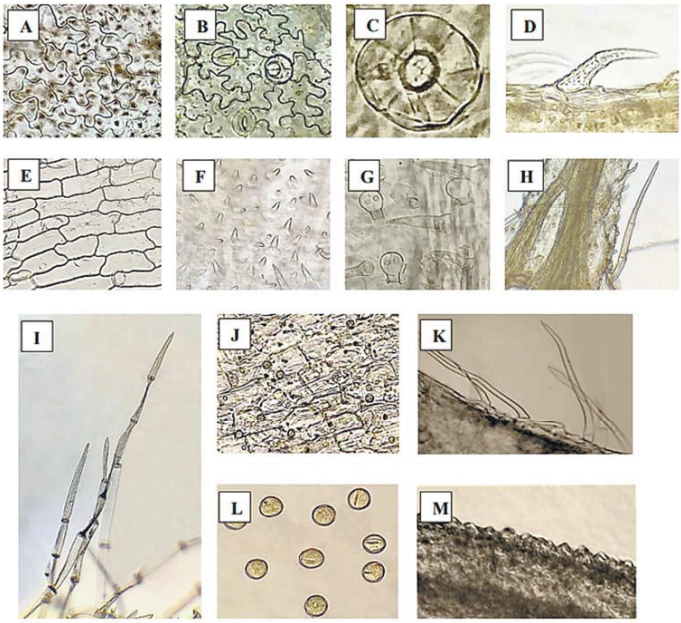

Рисунок 5 – Микроскопия травы *L. deminutus. Лист* (увеличение ×300): A – верхний эпидермис листа; B – нижний эпидермис листа; C – эфиромасличная железка; D – край листа с простым двуклеточным коленчатым волоском и бородавчатой кутикулой. *Чашечка* (E, F, G – увеличение ×300; H – увеличение ×100): E – клетки эпидермиса наружной стороны основания чашечки; F – остроконические волоски на наружной стороне основания чашечки; G – головчатые волоски с внутренней стороны чашечки; H – фрагмент зубца чашечки с простым многоклеточным волоском и бородавчатой кутикулой. *Венчик* (I, J, K – увеличение ×300; L, M – увеличение ×100): I – простые многоклеточные волоски со спадающимися клетками по краю верхней губы; J – мелкие друзы оксалата кальция; K – простые одноклеточные тонкостенные волоски венчика; L – пыльца; M – фрагмент эпидермиса нижней губы с сосковидными выростами

Порошок: фрагменты эпидермиса листьев, цветков, стеблей с характерными особенностями, присущими для цельного и измельченного сырья *L. deminutus*, кроме того встречаются фрагменты обломанных зубцов чашечки с каркасом волокнообразных клеток, а также фрагменты многоклеточных коленчатых волосков (частично обломанных).

Для определения БАВ разработаны и предложены аналитические реакции обнаружения иридоидов (с реактивом Трим-Хилла) и флавоноидов (реакция Chinoda). Также для обнаружения иридоидов предложена методика ТСХ-анализа в системе растворителей толуол – этилацетат – кислота уксусная (лед.) (70:25:5). В качестве стандарта рекомендован СО метиловый красный.

На хроматограмме обнаруживаются две зоны адсорбции иридоидов. Одна зона синего цвета находится на уровне зоны СО метилового красного, вторая зона адсорбции синего цвета располагается выше зоны СО.

Для раздела количественное определение адаптирована методика определения суммы иридоидов на основании методики, рекомендованной ГФ Республики Беларусь для анализа травы пустырника. Условия подобраны экспериментально: оптимальный экстрагент 50% спирт этиловый, размер частиц сырья 1 мм, соотношение сырье и экстрагент 1:100, время экстракции 60 минут, аналитическая длина волны – 512 нм, стандарт – гарпагида ацетат.

Относительная погрешность методики составила ±3,31% при проведении 9 независимых определений (табл. 6).

Таблица 6 – Метрологические показатели результатов количественного определения суммы иридоидов

f	$\bar{x}$	S	$S\bar{x}$	P,%	t(P,f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{E}$
8	1,0304	0,04434	0,01478	95	2,31	0,03	±3,31

Результаты валидации методики по критериям правильность, прецизионность, специфичность и линейность показали её пригодность.

Содержание суммы иридоидов в траве *L. deminutus* находилось в пределах от 0,73±0,01% до 1,19±0,02%.

Разработана и валидирована методика количественного определения суммы флавоноидов с использованием дифференциальной УФ-спектрофотометрии. В электронном спектре водно-спиртового извлечения максимум поглощения находится при длине волны 400 нм и совпадает со спектром раствора стандартного образца цинарозида, который выбран нами в качестве стандарта (рис. 6).

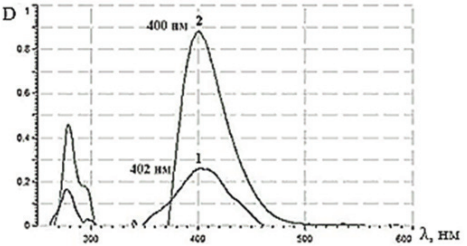

Рисунок 6 – Электронный дифференциальный спектр в присутствии $AlCl_3$: 1 – водно-спиртового извлечения *L. deminutus* травы; 2 – спиртового раствора стандарта цинарозида.

Установлены оптимальные параметры методики: степень измельчения сырья 1 мм, экстрагент 70% спирт этиловый, соотношение сырья и экстрагента 1:100, время 60 минут при однократной экстракции. На основании проведённых 9 независимых определений установлено, что ошибка методики не превышает ±2,98% (табл. 7).

Таблица 7 – Метрологические показатели результатов количественного определения суммы флавоноидов

f	$\bar{x}$	S	$S\bar{x}$	P,%	t(P,f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\bar{E}}$
8	1,018	0,03951	0,01317	95	2,31	0,03	±2,98

Содержание суммы флавоноидов находилось в пределах от 0,66±0,02% до 1,01±0,03%.

На основании анализа 5 партий сырья установлена норма содержания в траве *L. deminutus* суммы иридоидов (в пересчете на гарпагида ацетат) – не менее 0,6% и суммы флавоноидов (в пересчете на цинарозид) – не менее 0,5%.

В ходе товароведческого анализа были определены числовые показатели для цельного, измельченного и порошкованного сырья *L. deminutus*: влажность – не более 10%; золы общей – не более 10%, золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, – не более 4%; минеральной примеси – не более 1%. Измельченность сырья. Цельное сырье: частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм – не более 5%. Измельченное сырье: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм – не более 5%, частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм – не более 5%. Порошок: частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм – не более 5%, частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,18 мм – не более 5%. Примеси. Цельное и измельченное сырье: изменение окраски сырья (побуревшие и пожелтевшие части листьев и стеблей) – не более 7%; органической примеси – не более 2%; цельное сырье: стеблей – не более 47%, измельченное сырье: кусочки стеблей – не более 47%. Цельное, измельченное сырье, порошок: экстрактивных веществ, извлекаемых спиртом 60%, – не менее 25%.

Экспериментально установленный срок годности сырья травы *L. deminutus* составляет 2,5 года. Полученные результаты вошли в проект ФС «Пустырника уменьшенного трава – *Leonuri deminuti herba*».

По результатам ресурсоведческого исследования было определено, что в Усть-Ордынском Бурятском округе Иркутской области урожайность травы *L. deminutus* составляет от 57,0±2,34 г/м^2 до 85,2±5,80 г/м^2, эксплуатационный запас сырья на обследованных зарослях (6,3 га) – 771,84 кг, возможный ежегодный объем заготовки равен 110,26 кг.

Разработка и стандартизация пустырника уменьшенного экстракта сухого

Разработана технология экстракта сухого *L. deminutus* травы. Установлены оптимальные условия технологического процесса: размер частиц сырья 1 мм, экстрагент 60% спирт этиловый, соотношение сырье–экстрагент 1:18, трехкратная экстракция при температуре 50ºС продолжительностью I ступени экстракции 120 минут, II – 60 минут, III – 30 минут. Выход экстракта сухого из сырья составляет 25,30±1,50%.

В экстракте сухом установлено наличие иридоидов, флавоноидов, дубильных веществ, аминокислот, алкалоидов. Методом ТСХ определен

качественный состав иридоидов, который соответствует исходному сырью. Методом ВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС идентифицированы 18 фенольных соединений, аналогичные установленным веществам в траве *L. deminutus* (рис. 7). Содержание суммы флавоноидов в экстракте сухом составляет 8,33 мг/г, суммы фенилпропаноидов – 74,49 мг/г.

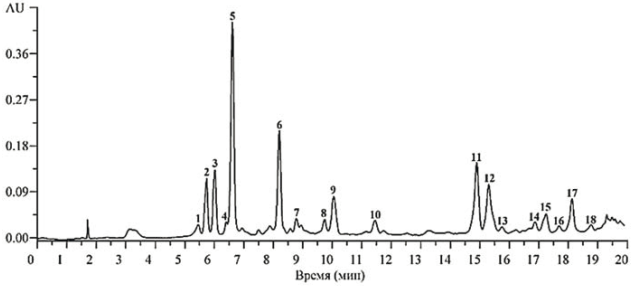

Рисунок 7 – Хроматограмма (ВЭЖХ-ДМД, 330 нм) экстракта сухого *L. deminutus* (номера пиков соответствуют данным таблицы 3)

Компонентный состав жирных кислот экстракта сухого представлен 14 соединениями. Наибольшее содержание приходится на пальмитиновую кислоту (35,27%), *α*-линоленовую кислоту (28,98%) и линолевую кислоту (14,96%).

Химический состав экстракта сухого соответствует сырью, отличия заключаются в более высоком содержании БАВ.

Для контроля качества экстракта сухого и формирования соответствующей ФСП адаптированы методики качественного и количественного анализа иридоидов и флавоноидов с соблюдением принципа «сквозной стандартизации».

Качественное обнаружение иридоидов и флавоноидов рекомендовано проводить с помощью аналитических реакций (реакция с реактивом Трим-Хилла, реакция Chinoda), а также методом ТСХ (иридоиды).

Адаптированы и валидированы методики количественного определения суммы иридоидов и суммы флавоноидов в экстракте сухом, разработанные ранее для травы *L. deminutus*. Относительная погрешность методики количественного определения суммы иридоидов составила ±2,06%, суммы флавоноидов – ±2,16% (табл. 8).

Таблица 8 – Метрологические показатели результатов количественного определения суммы иридоидов и суммы флавоноидов в экстракте сухом

БАВ	Метрологические показатели							
	f	$\bar{x}$	S	$S\bar{x}$	P,%	t(P,f)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{E}$
Иридоиды	8	1,950	0,05220	0,01740	95	2,31	0,04	±2,06
Флавоноиды	8	2,514	0,07076	0,02359	95	2,31	0,05	±2,16

При анализе 5 серий экстракта сухого содержание суммы иридоидов составило в пределах 1,75%–2,10%, суммы флавоноидов от 2,12% до 2,57%. Рекомендуемая норма содержания в экстракте сухом суммы иридоидов – не менее 1,5%, суммы флавоноидов – не менее 2,0%. Валидационная оценка методик по критериям специфичность, линейность, правильность, прецизионность является положительной.

Нормируемые показатели качества, установленные в соответствии с требованиями ГФ XIV издания, включены в проект ФСП на экстракт сухой *L. deminutus* травы. Установлен срок годности экстракта сухого – 2 года.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. В состав БАВ надземной части *L. deminutus* входят иридоиды, флавоноиды, дубильные вещества, сапонины, полисахариды, кумарины, алкалоиды, аминокислоты, аскорбиновая кислота. Выделено и идентифицировано 20 фенольных соединений, из них впервые для вида *L. deminutus* 6 флавоноидов и 5 фенилпропаноидов. Впервые идентифицировано 4 иридоида – гарпагид, изомер аюгола, 8-ацетилгарпагид и аюгозид; в продуктах гидродистилляции установлено содержание 16 соединений, из них 6 сесквитерпенов, тритерпеновое соединение – лупеол, эфиры карбоновых кислот. Состав жирных кислот представлен 8 насыщенными и 6 ненасыщенными кислотами (линолевая кислота составляет 42,03% в сумме жирных кислот, α-линоленовая кислота – 11,96%, олеиновая кислота – 11,82%). Определено содержание 9 макро-, 63 микро- и ультрамикроэлементов.

2. Количественное содержание БАВ в надземной части *L. deminutus* составило: иридоидов – 0,91±0,03%, флавоноидов – 1,02±0,03%, фенолкарбоновых кислот – 5,05±0,11%, сапонинов – 0,37±0,01%, полисахаридов – 6,48±0,19%, дубильных веществ (перманганатометрия) – 3,30±0,05%, дубильных веществ (спектрофотометрия) – 2,17±0,02%, аминокислот – 3,16±0,05%, аскорбиновой кислоты – 52,9±1,09 мг%. Органспецифическое распределение флавоноидов, фенилпропаноидов и иридоидов показало, что наибольшее их содержание находится в листьях и цветках растения. Максимальное накопление суммы флавоноидов и суммы иридоидов приходится на фазу цветения. Рекомендуется в качестве сырья заготавливать надземную часть растения с длиной стебля до 40 см в фазу цветения.

3. Определены основные диагностические макро- и микроскопические признаки сырья *L. deminutus*: стебли четырехгранные, опушенные; нижние и верхние листья пальчаторассеченные на пять узких сегментов (нижние) или три ланцентные доли (верхние); чашечка ширококоническая, коротко прижато-волосистая, венчик двугубый, сверху беловолосистый. Клетки эпидермиса со слабо- и сильноизвилистыми стенками (листья, цветки), 4-х клеточные железистые волоски повсеместно, головчатые волоски с овальной головкой (чашечка), многоклеточные кроющие трихомы со спадающимися

клетками, друзы (венчик), округлая пыльца с бороздкой посередине. Урожайность сырья *L. deminutus* в Усть-Ордынском Бурятском округе составляет от 57,0±2,34 г/м^2 до 85,2±5,80 г/м^2, эксплуатационный запас сырья – 771,84 кг, возможный ежегодный объем заготовки равен 110,26 кг.

4. Для стандартизации сырья предложены методики качественного определения иридоидов и флавоноидов (аналитические реакции, ТСХ иридоидов); разработаны и валидированы методики количественного определения иридоидов и флавоноидов спектрофотометрическим методом. Установлена в сырье *L. deminutus* норма содержания суммы иридоидов не менее 0,6%, суммы флавоноидов не менее 0,5%. Определены товароведческие показатели для цельного, измельченного и порошкованного сырья. Срок годности *L. deminutus* травы – 2,5 года (период наблюдения). Полученные результаты вошли в проект ФС «*Leonuri deminuti herba*».

5. Разработана технология экстракта сухого *L. deminutus* травы методом трехступенчатой экстракции в динамических условиях. Химический состав экстракта сухого соответствует составу исходного сырья, отличаясь большим количеством БАВ. Проведена стандартизация экстракта сухого. Предложены методики качественного и количественного определения иридоидов и флавоноидов. Норма содержания суммы иридоидов не менее 1,5%, суммы флавоноидов не менее 2,0%. Разработан проект ФСП «*Leonuri deminuti extractum siccum*».

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Соколова, Я.В. Влияние пустырника уменьшенного на ориентировочно-исследовательское поведение лабораторных животных / Я.В. Соколова // Природные соединения и здоровье человека: сборник научных статей Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием. Выпуск 2. – Иркутск, 2020. – С. 135–138.
2. Соколова, Я.В. Биологически активные вещества надземных органов пустырника уменьшенного (*Leonurus deminutus* V.I.Krecz.) флоры Прибайкалья / Я.В. Соколова // Материалы 74-й Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием «Актуальные вопросы медицинской науки», посвященной 75-летию победы в Великой Отечественной Войне 1941–1945 гг. – Ярославль, 2020. – С. 309–310.
3. Соколова, Я.В. Качественное и количественное определение иридоидов в траве пустырника уменьшенного (*Leonurus deminutus* V. I. Krecz.) / Я.В. Соколова // Материалы IV Дальневосточного медицинского молодежного форума. – Хабаровск, 2020. – С. 293–294.
4. Мирович, В.М. Исследование элементного состава надземных органов пустырника уменьшенного (*Leonurus deminutus* V. Krecz.),

произрастающего в Центральной Сибири / В.М. Мирович, Я.В. Соколова, Е.П. Чебыкин // **Человек и его здоровье**. – 2021. – Т. 24, № 4. – С. 74–82.
5. Соколова, Я.В. Исследование химического состава надземных органов пустырника уменьшенного / Я.В. Соколова // Материалы 87-й Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых учёных и студентов с международным участием. – Иркутск, 2021. – С. 231–234.
6. Соколова, Я.В. Изучение номенклатуры лекарственных препаратов растительного происхождения на основе пустырника / Я.В. Соколова, В.М. Мирович // Инновационные технологии в фармации: сборник научных трудов. Выпуск 8. – Иркутск, 2021. – С. 217–225.
7. Соколова, Я.В. К разработке товароведческих показателей пустырника уменьшенного травы / Я.В. Соколова, А.В. Сизых // Природные соединения и здоровье человека: сборник научных статей Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием. Выпуск 4. – Иркутск, 2022. – С. 84–86.
8. Соколова, Я.В. Микроскопическое исследование пустырника уменьшенного травы (*Leonurus deminutus* V. Krecz.) / Я.В. Соколова, В.М. Мирович // **Вестник Смоленской государственной медицинской академии**. – 2022. – Т. 21, № 1. – С. 196–203.
9. Соколова, Я.В. Разработка подходов к стандартизации пустырника уменьшенного (*Leonurus deminutus* V. Krecz.) травы / Я.В. Соколова, В.М. Мирович // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2022. – Т. 25, № 8. – С. 24–30.
10. Соколова, Я.В. Исследование компонентного состава продуктов гидродистилляции *Leonurus deminutus* V.I. Krecz травы / Я.В. Соколова, В.М. Мирович, Л.В. Дударева, Н.А. Соколова // **Медицинский вестник Башкортостана**. – 2022. – Т. 17, № 5(101). – С. 73–76.
11. Соколова Я.В., Мирович В.М., Оленников Д.Н., Дударева Л.В. Фенольные соединения и иридоиды надземной части *Leonurus deminutus* V.I. Krecz. (*Lamiaceae*) // **Химия растительного сырья**. – 2023. – № 3. – С. 133–141.
12. Патент № 2792361. Российская Федерация. Способ получения растительного средства, обладающего седативным, гипотензивным и антиоксидантным действием / В.М. Мирович, Я.В. Соколова, А.В. Цыренжапов, Д.Н. Оленников. – № 2022120893; заявл. 31.07.2022; опубл. 21.03.2023. – Бюл. № 9.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАВ – биологически активные вещества
БХ – бумажная хроматография
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография
ВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография с диодноматричным и масс-спектрометрическим детектированием
ВЭЖХ-УФ – высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием
ГФ – Государственная фармакопея
ГХ/МС – газовая хроматография/масс-спектрометрия
ИГМУ – Иркутский государственный медицинский университет
ЛРС – лекарственное растительное сырье
ОФС – общая фармакопейная статья
РФ – Российская федерация
СО – стандартный образец
СФ – спектрофотометрия
ТСХ – тонкослойная хроматография
ФС – фармакопейная статья
ФСП – фармакопейная статья предприятия