

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И АРОМАТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ»
(ФГБНУ ВИЛАР)

На правах рукописи

ЗВЕЗДИНА ЕКАТЕРИНА ВЛАДИМИРОВНА

ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РАСТЕНИЙ
СЕМЕЙСТВА *LAMIACEAE* LINDL.

3.4.2. Фармацевтическая химия, фармакогнозия

(фармацевтические науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени

кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель
доктор фармацевтических наук,
профессор РАН
Зилфикаров Ифрат Назимович

Москва - 2022 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. ПРЕДСТАВИТЕЛИ СЕМЕЙСТВА <i>LAMIACEAE</i> LINDL. КАК ИСТОЧНИКИ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НЕЙРОТРОПНЫХ СРЕДСТВ (<i>обзор литературы</i>)	15
1.1 Краткая ботаническая характеристика сем. <i>Lamiaceae</i>	15
1.2 Биологически активные вещества представителей растений сем. <i>Lamiaceae</i> , обладающие нейротропной активностью.	16
1.3 Сырьевая база и морфологическая характеристика представителей рода <i>Dracocephalum</i> L., <i>Nepeta</i> L.	26
1.4 Химический состав растений рода <i>Dracocephalum</i> L., <i>Nepeta</i> L.	34
1.5 Биологическая активность растений рода <i>Dracocephalum</i> L., <i>Nepeta</i> L.	59
Выводы к главе 1	68
ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ .	69
2.1 Объекты исследований	69
2.2. Методы исследований	70
2.2.1 Химические и физико-химические методы	70
2.2.2 Химико-технологические методы	76
2.2.3 Биологические методы	78
ГЛАВА 3. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ <i>DRACOCEPHALUM MOLDAVICA</i> L., <i>NEPETA GRANDIFLORA</i> ВИБ., <i>NEPETA CATARIA</i> L.	81
3.1 Изучение экстрактивных веществ из травы змееголовника молдавского, котовника крупноцветкового, котовника кошачьего	81
3.2 Обнаружение фенольных соединений	82
3.3 Разработка и валидация методики количественного определения суммы фенольных соединений в траве змееголовника молдавского	84
3.4 Изучение накопления суммы фенольных соединений в траве змееголовника молдавского, заготовленного в фазу бутонизации и	

цветения.	89
Выводы к главе 3	90
ГЛАВА 4. УСТАНОВЛЕНИЕ НОРМ КАЧЕСТВА ТРАВЫ	
ЗМЕЕГОЛОВНИКА МОЛДАВСКОГО	91
4.1 Качественное определение действующих веществ в надземной части змееголовника молдавского	91
4.2 Количественное определение суммы фенольных соединений	91
4.3 Определение показателей качества травы змееголовника молдавского	93
Выводы по главе 4	96
ГЛАВА 5. ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ	
ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РАСТЕНИЙ РОДА <i>NERETA</i> L.	97
5.1 Сравнительный анатомо-морфологический анализ котовника крупноцветкового и котовника кошачьего	97
5.2 Изучение химического состава различных извлечений из котовника крупноцветкового и котовника кошачьего	105
5.3 Компонентный состав эфирного масла травы котовника кошачьего в зависимости от мест произрастания	113
Выводы по главе 5	115
ГЛАВА 6. ПОЛУЧЕНИЕ СУХИХ ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ	
КОТОВНИКА КРУПНОЦВЕТКОВОГО И КОТОВНИКА	
КОШАЧЬЕГО И УСТАНОВЛЕНИЕ ИХ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА .	117
6.1 Химический состав	117
6.2 Разработка методики количественного определения розмариновой кислоты в сухом очищенном экстракте котовника кошачьего методом ВЭЖХ	118
6.3 Определение биологической активности полученных экстрактов . . .	122
Выводы по главе 6	122
ГЛАВА 7. РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ЭКСТРАКТОВ ИЗ	
НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ ЗМЕЕГОЛОВНИКА МОЛДАВСКОГО И	

СТАНДАРТИЗАЦИЯ «РОЗМАТИНА»	123
7.1 Идентификация фенольных соединений в сухом экстракте «Розматин»	124
7.2 Разработка методики количественного определения суммы фенольных соединений в «Розматине». Валидация методики	135
7.3 Определение биологической активности «Розматина»	139
Выводы к главе 7	141
Общие выводы	141
Список использованной литературы	144
Приложение 1. Патент на способ получения «Розматина» из травы змееголовника молдавского	164
Приложение 2. Акт внедрения проекта фармакопейной статьи (ФС) «Змееголовника молдавского трава»	165
Приложение 3. Акт внедрения проекта нормативной документации «Розматин», экстракт сухой»	166
Приложение 4. Отчет о валидации количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту в траве змееголовника молдавского	167
Приложение 5. Отчет о валидации методики количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту в субстанции «Розматин»	168
Приложение 6. Спецификация экстракта сухого «Розматин»	174
Приложение 7. Протокол изучения острой токсичности сухого экстракта «Розматин»	171
Приложение 8. Протокол изучения нейротропной активности и влияния на показатели сердечно-сосудистой системы сухого экстракта змееголовника молдавского «Розматин»	173
Приложение 9. Протокол исследования нейротропной активности экстракта змееголовника молдавского под условным названием «Розматин» на модели приподнятый крестообразный лабиринт	179

Приложение 10. Протокол изучения нейротропной активности змееголовника молдавского экстракта сухого под условным названием «Розматин» на модели «открытое поле» у крыс	182
Приложение 11. Протокол изучения нейротропной активности «Розматина»	186
Приложение 12. Протокол изучения экстракта на экссудативную стадию воспаления на модели 1 % формалинового отёка	189
Приложение 13. Протокол изучения гастропротективного эффекта «Розматина»	193
Приложение 14. Протокол изучения фармакологической активности котовника кошачьего и котовника крупноцветкового	196
Приложение 15. Протокол исследования противовоспалительной активности экстрактов котовника кошачьего и котовника крупноцветкового	210
Приложение 16. Лабораторный регламент на производство сухого экстракта «Розматин»	214

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Разработка новых эффективных и безопасных лекарственных средств растительного происхождения, влияющих на сердечно-сосудистую и центральную нервную системы является актуальным направлением современной фармацевтической науки.

В большинстве растений семейства *Lamiaceae* биологически активные вещества представлены такими классами химических соединений как флавоноиды, флавоноидные гликозиды, флавоноидные глюкурониды, фенилпропаноиды, антоцианы.

Одним из ярких представителей сем. *Lamiaceae* является род *Dracosephalum* L., который насчитывает около 60 видов, встречающихся в умеренной климатической зоне северного полушария. Вид змееголовник молдавский (*Dracosephalum moldavica* L.) повсеместно произрастает в причерноморском регионе, европейской части России, в Сибири, Средней Азии, на Дальнем Востоке, в Китае, Монголии и др. Введен в культуру как пряно-ароматическое, декоративное и лекарственное растение. В ФГБНУ ВИЛАР был выведен новый сорт «Нежность» [41].

Нами проведен анализ литературных данных по использованию травы змееголовника молдавского в традиционной китайской медицине. Особое внимание привлекли полезные свойства экстрактов для лечения болезней сердечно-сосудистой системы, таких как тахикардия, ишемическая болезнь сердца, артериальной гипертензии, атеросклероза, невралгии, а также полученные экстракты обладают кардиопротективной, нейропротекторной и иными фармакологическими активностями [4, 87, 109, 122, 156, 171, 179].

На основании вышеизложенного для разработки новых лекарственных растительных препаратов (ЛРП) в качестве объекта исследования нами выбран змееголовник молдавский (*Dracosephalum moldavica* L.).

Наряду со змееголовником молдавским к семейству *Lamiaceae* относится род Котовник (*Nepeta* L.). Род котовник насчитывает около 250 видов, встречающихся в умеренной климатической зоне Европы, в Азии, Северной

Африке, в горах тропической Африки и др. *Nepeta* один из крупных родов *Lamiaceae* [42].

Наибольшее разнообразие и богатство видов обнаружено в двух районах Юго-Западной Азии, особенно в Иране и Западных Гималаях, включая Гиндукуш. В России произрастает около 82 видов котовников в горных районах Закавказья [21]. Котовник кошачий (*Nepeta cataria* L.) и котовник крупноцветковый (*Nepeta grandiflora* Vieb.) имеет широкое использование в пищевой и парфюмерной промышленности. Котовник кошачий культивируется в Западной Европе, США, СНГ для получения эфирного масла [29].

Трава котовника кошачьего входит в состав чаев с жаропонижающим и успокоительным эффектом. Настой травы котовника кошачьего снижает температуру и уменьшает кожные высыпания при кори и ветряной оспе [107].

Котовник крупноцветковый широко распространен на Северном Кавказе и повсеместно произрастает в Карачаево-Черкесской Республике [43].

Траву котовника крупноцветкового, заготовленную в фазу массового цветения (июнь–июль), применяют в традиционной медицине в виде отваров и настоев в качестве противовоспалительного, жаропонижающего спазмолитического и мягкого седативного средства, а также при анемии в качестве заменителя чая [43, 79]. Установлено, что водно-спиртовые извлечения из надземной части этих растений обладают анксиолитическими, антидепрессантными свойствами [67, 144, 145, 151].

Химический состав рода Котовник в основном представлен фенилпропаноидами, иридоидами и флавоноидами [145].

В этой связи дальнейшее изучение выбранных растений в качестве объектов исследования, включая получение суммарных экстрактов и биологически активных фракций и индивидуальных веществ, является актуальным.

Степень разработанности темы исследования. Большинство публикаций преимущественно зарубежных исследователей посвящены изучению химического состава и биологической активности змееголовника молдавского.

В надземной части змееголовника молдавского выделено 31 соединение

флавоноидной природы: кемпферол, кверцетин, эскулетин, диосметин, акацетин, апигенин, лютеолин, цирцимаритин, сальвигинин, сантафлаван, агастахозид, акацетин-7-О-β-D-гликозид, диосметин-7-О-неогесперидозид, акацетин-7-О-неогесперидозид, лютеолин-7-О-неогесперидозид, лютеолин-7-О-β-D-глюкозид, апигенин-7-О-β-D-глюкозид, лютеолин-7-О-β-D-глюкуронид, апигенин-7-О-β-D-глюкуронид, диосметин-7-О-β-D-глюкуронид, акацетин-7-О-β-D-глюкуронид, гесперидин, гиперозид, дигидрокверцетин, цинарозид, тилианин, кемпферол, линарин, нарингенин, хризозериол, гарденин В, 6-малонил-арбутин, скрофулеин, танакин-8-О-β-D-глюкопиранозид, изорамнетин [172]

В 70% водно-спиртовом экстракте наземной части змееголовника молдавского (после удаления экстрагента) методом ВЭЖХ-МС идентифицировали порядка 9 компонентов. Доминирующим компонентом является розмариновая кислота, а также флавоноид - лютеолин-7-О-глюкуронид [18].

Биологически активные вещества имеют широкий спектр применения для лечения сердечно-сосудистых заболеваний. В исследовании Mei-e Tan и др. разработали твердые липидные наночастицы с суммарным флавоноидным экстрактом из *Dracocephalum moldavica* L., и оценили терапевтический эффект на модели ишемического реперфузионного повреждения миокарда у крыс. Результаты показали, что суммарный экстракт флавоноидов из змееголовника молдавского и твердые наночастицы с включенным суммарным флавоноидным экстрактом из змееголовника молдавского обеспечивали защиту миокарда, а защитный эффект наночастиц с суммарным флавоноидным экстрактом был значительно выше, чем у исходного экстракта, в зависимости от размера инфаркта, гистопатологического изучения, уровней кардиоспецифических ферментов (лактатдегидрогеназы и креатинкиназы) и цитокинов (интерлейкин-β, фактор некроза опухоли-α)[157].

Водное извлечение из надземной части *D. moldavica* дозозависимо уменьшало количество переходов в тесте «избегание». Эффект может считаться анксиолитическим; однако те же самые дозы также вызывали значительное

сокращение общей активности мышей в тесте «открытое поле» по сравнению с контрольной группой. Это влияние на поведение является следствием уменьшения активности животных из-за седативного действия лекарственных препаратов. Полученные результаты аналогичны тем, которые наблюдаются при высокой дозе диазепама; в них диазепам также вызывал снижение количества переходов между светлым и темным отсеками в тесте «избегание» и общей активности в тесте «открытое поле».

Водное извлечение из травы *D. moldavica* обладает седативной и миорелаксирующей активностью, снижает у подопытных животных локомоторную активность и приводит к общему ингибированию активности нейронов в центральной нервной системе (ЦНС)[109].

Установлено, что розмариновая и кофейная кислоты содержащиеся в экстракте змееголовника молдавского вызывают антидепрессивный эффект и проявляют анксиолитическую активность [128, 129].

В настоящее время змееголовник молдавский востребован не только как эфиромасличное, но и как фармацевтическое сырье, т. к. входит в состав биологически активных добавок, чаев, в составе которых оказывает не только лекарственное действие, но и улучшает вкус, выпускается в виде брикетов и капсул. Змееголовник молдавский входит в состав чаев «Finetea naturii», «Digesti plus», «Baby seaі» и др., производимых фирмой «Doctor Farm» (Молдова). В некоторых странах Европы его выращивают в качестве - заменителя Melissa лекарственной [17].

В Германии разработаны стандарты на сухую траву змееголовника молдавского, методы испытания сырья на подлинность [18].

В Российской Федерации зарегистрированы биологически активная добавка к пище «Змееголовник молдавский», применяемая в качестве источника флавоноидов, дубильных веществ, содержащей эфирное масло (пакеты по 25-500 г, фильтр-пакеты по 1,5-2,0 г, брикеты по 2,0-5,0 г, гранулы по 25-500 г) и трава змееголовника молдавского («Змееголовник молдавский-С») для применения в качестве биологически активной добавки к пище [35].

Другими представителями сем. яснотковых являются котовник крупноцветковый и котовник кошачий. Эфирное масло *Nepeta cataria* и непеталовая кислота значительно продлевали сон, вызванный гексобарбиталом [110]. Непетолактоны, содержащиеся в эфирном масле из травы представителей рода *Nepeta* L., обладают анксиолитической, седативной и гипнотической активностью [50, 75].

Трава котовника кошачьего входит в состав чаев с жаропонижающим и успокоительным эффектом [40]

На сегодняшний день из видов рода *Nepeta* выделено более двадцати фенольных производных. Наиболее часто присутствующими соединениями являются кофейная, розмариновая, хлорогеновая, феруловая, п-кумаровая, галловая, сиригловая, 4-гидроксибензойная и ванилиновая кислоты, кониферин.

В настоящее время более тридцати пяти флавоноидов (флавоны, флаванон, флавонолы и флаванолы) и их производных были выделены из различных видов *Nepeta*. Флавоны, а именно цирсимаритин, изотимусин (8-гидроксицирсимаритин), генкванин, сальвигенин, 8-гидроксицирсилиол и 8-гидроксисальвигенин были обнаружены у многих видов *Nepeta* и выступают в качестве отличительной хемотаксономической особенности этого рода [144, 145, 151].

Несмотря на пристальное внимание исследователей к этим объектам потенциал их использования в качестве фармацевтических субстанций и лекарственных препаратов, остается нереализованным.

Цель работы – разработка способа получения активной субстанции со специфической биологической активностью, установление химического состава субстанции и её стандартизация.

Для реализации данной цели были решены следующие основные **задачи**:

1. Определен химический состав фенольных соединений змееголовника молдавского травы.
2. Изучено накопление фенольных соединений в образцах сырья змееголовника молдавского, произрастающих в разных климатических зонах.

3. Разработан способ получения экстракта сухого «Розматин» из травы змееголовника молдавского и установлена специфическая биологическая активность.

4. Проведена стандартизация сырья и экстракта сухого «Розматин»: Разработаны методики количественного определения суммы фенольных соединений в сырье и в «Розматине»; проведена валидация методик.

5. Разработан проект ФС и НД на сырьё и на сухой экстракт «Розматин» из травы змееголовника молдавского.

6. Проведен морфолого-анатомический анализ сырья котовника крупноцветкового и котовника кошачьего.

7. Проведено фитохимическое исследование по получению различных экстрактов и фракций из травы котовника крупноцветкового и котовника кошачьего с целью поиска специфической биологической активности.

8. Определен химический состав полученных активных экстрактов из травы котовника крупноцветкового и котовника кошачьего.

Научная новизна работы. Впервые разработан способ получения сухого экстракта «Розматин», обладающий активирующим, тонизирующим действием на сердечно-сосудистую и нервную системы. Получен 1 патент. Установлен химический состав «Розматина», который представлен флавоноидами флавоного типа и фенилпропаноидами с преобладанием розмариновой кислоты. Впервые разработаны методики и проведена валидация количественного определения фенольных соединений в траве змееголовника молдавского и полученном из нее сухом экстракте «Розматин». Разработана НД на траву и субстанцию. Определены показатели качества травы змееголовника молдавского.

Впервые проведено количественное содержание суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту в образцах змееголовника молдавского травы, заготовленной в различных климатических зонах произрастания.

По результатам фармакогностического изучения составлено описание морфологических признаков травы двух видов котовника и определены

отличительные диагностически значимые анатомические признаки. Установлено, что сухие экстракты оказывают достоверно выраженное седативное и противотревожное действие.

Теоретическая и практическая значимость работы. На основании проведенных фитохимических исследований был разработан сухой экстракт «Розматин» из змееголовника молдавского, способ получения которого был запатентован. В отделе экспериментальной и клинической фармакологии была определена специфическая биологическая активность. Получены достоверные результаты, по которым можно рекомендовать эту субстанцию для разработки препарата «Розматин» и его лекарственных форм.

- Разработан способ получения сухого экстракта «Розматин» (Акт внедрения).

- Разработана методика количественного определения суммы фенольных соединений в траве змееголовника молдавского, проведена ее валидация (проект НД)

- Разработана методика количественного определения суммы фенольных соединений в сухом экстракте «Розматин». Проведена валидация методики и стандартизация экстракта (проект НД).

- Разработан лабораторный регламент на способ получения «Розматина».

Методология и методы исследования. При выборе объектов исследования проводили анализ литературных данных отечественных и зарубежных авторов для растений семейства *Lamiaceae*: определение химического состава растений, поиск биологической активности, а также данных на наличие сырьевой базы. При разработке способа получения «Розматина» проведен патентный поиск, а для стандартизации сырья и «Розматина» использовались общие фармакопейные статьи ГФ XIV издания. В экспериментальной части работы применялись физико-химические методы исследования: спектральные (УФ-спектрофотометрия, спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР) ^1H -и ^{13}C -ЯМР), хроматографические (колоночная и тонкослойная хроматография (ТСХ), высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым (УФ) и

масс-спектрометрическим детектированием (МС/МС), (ВЭЖХ-УФ-МС), газожидкостная хроматография с масс-спектрометрическим детектированием (ГЖХ-МС)).

Положения, выносимые на защиту:

- Результаты установления химического состава травы змееголовника молдавского, котовника кошачьего, котовника крупноцветкового

- Результаты разработки стандартизации травы змееголовника молдавского

- Результаты разработки сухого экстракта из змееголовника молдавского и определение компонентного состава.

- Результаты установления химического состава экстракта «Розматин».

- Результаты стандартизации сухого экстракта «Розматин».

- Результаты получения экстрактов из котовника кошачьего и котовника крупноцветкового с целью определения специфической активности.

- Результаты установления химического состава экстрактов из котовника кошачьего и котовника крупноцветкового.

Степень достоверности и апробации результатов. Достоверность полученных результатов подтверждается в ходе многократных исследований с последующей статической обработкой экспериментальных данных. Все результаты получены с применением фармакопейных, аттестованных и валидированных методик, в том числе ранее описанных в научной литературе, на приборах, прошедших поверку и калибровку. Основные результаты работы доложены, обсуждены или представлены на международных конференциях в частности: «Молодые ученые и Фармация XXI века» (Москва, 2018 г), «Метаболомика и качество жизни» (Москва, 2019), «Современные тенденции развития технологий здоровьесбережения» (Москва, 2019), XXVII Российский национальный конгресс «Человек и лекарство (Москва, 2020), «Гармонизация подходов к фармацевтической разработке» (Москва, 2020)

Публикации. По теме диссертации опубликовано 10 научных статей, 6 статей в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, из них 3 – в

издании базы данных Scopus, 1 – в издании WoS, получен 1 патент РФ на изобретение.

Связь задач исследования с планом фундаментальной науки. Диссертация выполнена в соответствии с планом научно-исследовательской работы ФГБНУ «Всероссийского научного исследовательского института лекарственных и ароматических растений» по теме №0576-2019-0010 «Поиск активных фракций природных соединений, разработка способов их получения из растительного сырья, методик стандартизации и создание на их основе современных лекарственных форм» (Регистрационный номер АААА-А17-117080910129-7)

Соответствие диссертационной работы паспорту научной специальности. Исследование было проведено в соответствие научной специальности – 3.4.2 Фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки).

Личный вклад автора. Проведен поиск экстрактов и фракции для установления специфической биологической активности, анализ данных литературы, выполнен весь спектр экспериментальных исследований.

Объем и структура диссертационной работы. Диссертация изложена на 214 страницах машинописного текста, структура диссертации состоит из введения, обзора литературы (1 глава), описания объектов, материалов и методов исследования (2 глава) и пяти глав экспериментальных исследований, заключения, общих выводов, списка литературы, включающего 180 источника, из них 137 на иностранном языке, и 16 приложений. В диссертацию включены 54 рисунка и 20 таблиц.

ГЛАВА 1. ПРЕДСТАВИТЕЛИ СЕМЕЙСТВА *LAMIACEAE* LINDL. КАК ИСТОЧНИКИ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ НЕЙРОТРОПНЫХ СРЕДСТВ (обзор литературы)

1.1 Краткая ботаническая характеристика сем. *Lamiaceae*

Большинство видов яснотковых представляют собой однолетние и многолетние травы, реже - полукустарники и кустарники, и лишь некоторые имеют древоподобные формы. Плод обычно четырёхорешек (ценобий), погружен в чашечку, которая легко отстает после отцветания; редко плод состоит из 1 или 3 орешков, ввиду недоразвития их части, но никогда не бывает ни ягодным, ни коробчатым или другого вида. Стебли чаще всего четырёхгранные, у немногих представителей округлые; листорасположение супротивное, а пары листьев расположены супротивно, цельные или различно расчленённые. Прилистники отсутствуют. В углах листьев цветки, как правило, одиночные, парные или собранные в немногочисленные дихазальные соцветия на коротких ножках; причём каждая пара таких соцветий, соприкасаясь крайними цветками, образует ложное кольцо цветков, а при тесном расположении таких колец в верхней части стебля все 30 собрание цветов принимает вид ложного колоса (так, например, у мяты, львиного хвоста, котовника и др.), причём верхние листья значительно уменьшены и принимают уже характер прицветников. Чашечка, всегда остающаяся при плоде, как уже сказано, обыкновенно колокольчатая и пятизубая, ко времени зрелости семян твердеет, и зубцы её становятся колючими; реже – двугубая. Венчик всегда трубчатый, но на конце сильно варьирует: то ясно двугубый с сильно развитыми лопастями (глухая крапива, шалфей, пикульник и др.), то неполногубый или одногубый (живучка, дубница), то обрезанный почти правильно – и поэтому двугубость выражена слабо. Тычинок 4, редко 2, прикрепленных к трубке венчика, с которым они и отваливаются вместе; они то скрыты под вогнутой верхней губой венчика, то выставляются наружу, если венчик неполногубый или срезанный. [5].

Семейства *Lamiaceae* Lindl. представляет большой интерес исследователей всего мира с точки зрения содержания в них ценных биологически активных веществ. Представители данного семейства являются источником для получения лекарственных препаратов («Валемидин» (пустырник и мята перечная), «Мелисон»(мелисса лекарственная), «Ломагерпан» (мелисса лекарственная), «Сальвин»(шалфей лекарственный), «Пертуссин»(Чабрец), «Персен»(мелисса лекарственная, мята перечная), «Ново-пассит» (мелисса лекарственная), «Нервофлукс» (лаванда, мята лимонная), «Фито Ново-Сед» [8] (мелисса лекарственная, пустырник) и др. [11].

1.2 Биологически активные вещества представителей растений сем. *Lamiaceae*, обладающие нейротропной активностью

Наличие анксиолитического эффекта установлено для стероидов цистерона и эргостерон-5,8-эндопероксида из корней живучки расставленной (*Ajuga remota* Benth.) [105].

Тилианин, выделенный из метанольного экстракта надземной части многоколосника мексиканского (*Agastache mexicana* a (Kunth) E.F. Linton & Epling), проявлял анксиолитическую активность за счет регуляции гамма-аминомасляной кислоты / бензодиазепинов (ГАМК / BZD) по сравнению со стандартным лекарственным средством диазепамом в течение 60 и 30 минут после введения самцам мышей Swiss Albino. [47]

Антидепрессивную активность водно-спиртового извлечения из надземной части белокудренника черного (*Ballota nigra* L.) связывают с фенилпропаноидами [60]. Смесь фенилпропаноидных гликозидов (вербаскозид, орабанчозид) значительно продлевала сон, вызванный пентобарбиталом, уменьшала локомоторную активность у мышей и вызывала замедление электроэнцефалографического следа [130]. Для исследования способности фенилпропаноидов, полученных из водно-спиртового извлечения из надземной части белокудренника черного, связываться с бензодиазепиновыми,

дофаминергическими и морфиновыми рецепторами, применяли тесты на аффинность с полосатым телом мозга крыс (стриатум), мозгом целиком и биопрепаратами, богатыми рецепторами. Результаты показали, что четыре фенилпропаноида из пяти обнаруженных (вербаскозида, форситозида В, аренариозида, баллотетрозида и кофейной кислоты) способны связываться с изученными рецепторами, оказывая нейроседативное действие в дозах от 0,4 до 4,7 мг/мл [60]. Фенилпропаноидные производные, выделенные из надземной части *Ballota nigra* subsp. *anatolica*, представляют интерес как имеющие также антиоксидантную активность [52, 162].

В водном и метанольном извлечениях из листьев пачучки мексиканской (*Clinopodium mexicanum* (Benth.) Govaerts) обнаружен флавоновый гликозид 2S-неопинцирин [(2S)-5-гидрокси-4'-метоксифлавонон-7-О- β -D-глюкопиранозил-(1 \rightarrow 6)- β -D-рамнозид}], который оказывал в опытах («доска с отверстиями», открытое поле» и пролонгирование сна, вызванное пентобарбиталом натрия) на мышцах Swiss Webster анксиолитическое действие, связанное с влиянием на ГАМК-рецепторы [55]

Выраженные седативные свойства обнаружены у водно-спиртового извлечения из надземной части пустынноколосника рассеченного (*Eremostachys laciniata* (L) Bunge), в котором идентифицированы флавоноиды (лютеолин, апигенин, 5,8-дигидрокси-6,7-диметоксифлавонон, 5,7-дигидрокси-6,8-диметоксифлавонон, лютеолин 7-О- β -D-глюкозид) [123]. У водного извлечения надземной части пустынноколосника рассеченного *in vivo* с использованием теста «принудительное плавание» в низких дозах обнаружено антидепрессантное действие, а в более высоких дозах – депрессивное. Авторы исследования считают, что антидепрессантное свойство связано с наличием в извлечении флавоноидов производных апигенина; а депрессивное, выраженное в увеличении продолжительности неподвижности и наблюдаемое в более высоких дозах извлечения, обусловлено седативным эффектом лютеолина [123].

Из цветков лаванды колосковой (*Lavandula spica* L.) получен жидкий экстракт (экстрагент – 40% спирт этиловый), для которого установлена

седативная активность. Отмечено, что активность экстракта связана с присутствием в его составе фенилпропаноида лавандозида (4-О-β-D-глюкопиранозида 4-гидрокси-3-метоксикоричной кислоты) [24, 25, 98].

Из бутанольной фракции извлечения из травы пустырника сердечного (*Leonurus cardiaca* var. *vulgaris* Briquet.) был выделен фенолпропаноид лавандулифолизид, который обладает выраженной отрицательной хронотропной активностью (снижает частоту сердечных сокращений), способностью изменять параметры электрокардиограммы (ЭКГ), а именно, продлевать интервалы P-Q и Q-T QRS-комплекса (желудочкового комплекса) и снижать артериальное давление. При его исследовании установлено также, что он не ответственен за седативный эффект, так как даже в дозах 800 и 1600 мг/кг лишь незначительно снижал подвижность мышей [167]. В отличие от суммарного бутанольного экстракта, лавандулифолизид не снижает спонтанную локомоторную активность, поэтому его свойства не отражают все фармакологические эффекты препаратов из травы *Leonurus cardiaca* [113].

В водно-спиртовых извлечениях из травы пустырника обнаружены ответственные за седативные и снотворные свойства иридоиды – монотерпеновые соединения, имеющие в своей структуре частично гидратированную циклопентан/с/пирановую систему (аюгол, аюгозид, гарпагид, гарпагида ацетат), фенилпропаноиды (кофейная, феруловая, гидроксикоричная кислоты), флавоноиды (рутин, гиперозид, кверцитрин), азотистые основания (леонуриин и стахидрин или леонурикардин) и дубильные вещества [15, 26, 36]. Нейромодулирующий и нейропротекторный эффекты экстракта пустырника японского (*Leonurus japonicus* Houtt.) связывают с наличием в их составе азотистых оснований (леонуриин, стахидрин) и тритерпеноидов (леонурузолеанолид А), седативный – с иридоидами (стегиозид). Настойка травы пустырника японского также ингибирует 5-HT_{3A}-рецепторы, антагонистом которых является леонуриин с IC₅₀ 2,17±0,15 мМ. Так как этот рецептор участвует в расстройстве моторики желудочно-кишечного тракта, можно предположить возможность использования препаратов из травы пустырника для лечения рвоты

и тошноты [133, 177]. Нейропротекторное действие синтезированного алкалоидоподобного азотистого основания леонурина на нервные клетки в модели ишемического инсульта у крыс обусловлено, главным образом, снижением образования активных форм кислорода, благодаря чему поддерживается правильное функционирование митохондрий и, следовательно, происходит ингибирование апоптоза. Предполагается, что леонурин может применяться для профилактики и лечения ишемических инсультов, благодаря его антиоксидантным свойствам и участию в механизме апоптоза [167]. Нарингенин (5,7,4'-тригидроксифлаванон), полученный из надземной части мяты водной (*Mentha aquatica* L.), обладает выраженным анксиолитическим эффектом. Введенный внутривенно в дозе 100 мг/кг, нарингенин приводил к значительному уменьшению основной и мелкой моторики ($P > 0,5$). Сочетание нарингенина в дозе 100 мг/кг с мидазоламом в дозе 1,5 мг/кг приводило к более значительному анксиолитическому эффекту по сравнению с комбинацией нарингенина в дозе 100 мг/кг с флумазенилом в дозе 3 мг/кг ($P < 0,05$) [49]. Эфирное масло котовника кошачьего (*Nepeta cataria* L.) и непеталовая кислота значительно продлевали сон, вызванный гексобарбиталом [75]. Непетолактоны, содержащиеся в эфирном масле из травы представителей рода Котовник (*Nepeta* L.), обладают анксиолитической, седативной и гипнотической активностью [50, 57]. Оценивалась седативная активность урсоловой кислоты, выделенной из надземной части котовника Сибторпа (*Nepeta sibthorpii* Benth.). При пероральном применении в дозе 2,3 мг/кг урсоловая кислота оказывала значительное депрессивное действие на ЦНС, что выражалось в снижении спонтанной двигательной активности. Урсоловая кислота обладает седативным и противосудорожным эффектами, ее активность может быть опосредована через ГАМК-энергическую систему, поскольку она увеличивает время ожидания приступов, вызванных пентилентетразолом (PTZ), антагонист ГАМК- α -рецепторов. Кроме того, урсоловая кислота проявляет умеренное сродство к бензодиазепиновому сайту ГАМК- α -рецепторов [67, 158]

Перилла – однолетнее травянистое растение, выращивается с давних пор как масличная и пищевая культура, первоначально в Китае и странах Дальнего Востока, затем по всему миру. Трава применяется в народной медицине.

В экстрактах, полученных из листьев периллы (*Perilla frutescens* (L.) Britton), содержатся розмариновая и кофейные кислоты [159]. Было установлено, что выделенные в чистом виде розмариновая и кофейная кислоты вызывают антидепрессивный эффект и проявляют анксиолитическую активность в стрессовом тесте. Нейрохимические исследования показали, что ни розмариновая, ни кофейная кислота не влияют на поглощение моноаминов или активность моноаминоксидазы, что лежит в основе терапевтической ценности существующих клинически эффективных антидепрессантов. Ранее было обнаружено, что кофейная кислота проявляет антидепрессивный и анксиолитический эффект посредством модуляции сигналов, опосредованных альфа-1-адренорецептором, а также ослабляет понижающую регуляцию транскрипции белка BDNF (нейротрофического фактора мозга – Brain-Derived Neurotrophic Factor), которая возникает в результате воздействия принудительного плавания. Эти результаты свидетельствуют о том, что розмариновая и кофейная кислоты могут оказывать антидепрессивное и анксиолитическое действие по механизму, отличному от механизма действия препаратов, используемых в настоящее время в клинической практике [128, 129]

Выделенные из листьев розмарина лекарственного (*Rosmarinus officinalis* L.) вещества (дитерпен розманол, флавоноиды салвигенин и цирсимаритин) исследовали на мышах на наличие острой токсичности, антиноцицептивное и антидепрессантное действие (в тестах «подвешивание за хвост» и «принудительное плавание»), влияние на тревожность (тесты «лабиринт» и «темно-светлая камера»). Проведенные исследования выявили у изучаемых соединений антиноцицептивные, антидепрессантные и анксиолитические свойства, реализуемые путем двухфазной модуляции ГАМКА-рецепторов. Анксиолитическая активность всех трех соединений не усиливалась под влиянием антагониста бензодиазепиновых рецепторов флумазенила, однако была

ингибирована под влиянием аналептика петилентетразола (коразола), что указывает на механизм действия через ГАМКА-рецепторы на участке связывания, отличном от участка, обладающего афинностью к бензодиазепину. Также было установлено, что выделенные соединения не вызывают признаков острой токсичности в дозах от 50 до 200 мг/кг [45].

Карнозол и карнозоловая кислота, выделенные из листьев шалфея лекарственного (*Salvia officinalis* L.), ингибируют связывание трет-бутилбициклофторо-[35S]-тионата в хлоридном канале ГАМК-бензодиазепинового рецепторного комплекса в ткани головного мозга (при значениях IC_{50} 57 ± 4 мкМ и 33 ± 3 мкМ, соответственно), но не оказывают никакого влияния на связывание [3 H]-мусцимола, [3 H]-диазепама или [3 H]-флуниотразепама. Поэтому место действия этих соединений, по-видимому, находится непосредственно на хлоридном канале и, следовательно, отличается от милтирона [138]. В другом исследовании в результате фракционирования метанольного извлечения из листьев шалфея лекарственного выявлены три флавонола и два абиетановых дитерпена, функционирующие как активные в отношении бензодиазепиновых рецепторов вещества. Некоторые флавонолы, такие как апигенин [80], лютеолин [58], линарин [66] и гиспидулин [92] проявляют анксиолитические эффекты через ГАМК-ергический механизм, аналогичный с бензодиазепинами. Апигенин, гиспидулин и цирсимаритин конкурентно ингибируют связывание 3 H-флумазенила к бензодиазепиновому рецептору с IC_{50} значениями 30, 1,3 и 350 нМ, соответственно. Величина IC_{50} абиетановых дитерпенов, 7-метоксисманола и галдозола составляла 7,2 и 0,8 нМ, соответственно [91].

В водно-спиртовом извлечении из листьев шалфея стойкого (*Salvia elegans* Vahl.) обнаружены и выделены урсоловая кислота и флавоноид 5-O-(6-рамнозилглюкозид)-7-гидрокси-4'-метоксифлавонон [104], которые проявляли антидепрессивную активность у мышей [73]. Было показано, что обнаруженные в этанольном извлечении из надземной части растения шалфея Гуарани (*Salvia guaranitica* A. St.-Hil. ex Benth.) соединения - флавонол цирцилиол (5,3',4'-

тригидрокси-6,7-диметоксифлавоны) и этиловый эфир кофейной кислоты, являются лигандами с конкурентно низким сродством к бензодиазепиновым рецепторам [108]. В другом исследовании цирцириол проявлял дозозависимое потенцирующее действие на сон, вызванный пентобарбиталом. Он оказался более сильным конкурентом в связывании 3H-золпидема ($K_i = 20$ мкМ), чем в связывании 3 H-флунизепема ($K_i = 200$ мкМ) с бензодиазепиновыми рецепторами коры головного мозга крысы. Следовательно, цирцириол обладает седативным и снотворным свойствами, вероятно, действуя на так называемый бензодиазепиновый рецептор типа I [161].

Корень *S. miltiorrhiza* Bunge (ш. краснокорневищного) широко используется в Китае для получения препаратов, используемых при лечении неврастенической бессонницы [56]. Из извлечения, полученного диэтиловым эфиром из корней шалфея краснокорневищного (*Salvia miltiorrhiza* Bunge), были выделены десять дитерпеновых хинонов, которые в исследовании, проведенном радиолигандным методом, ингибируют связывание [3 H]-флунизепема с центральными бензодиазепиновыми рецепторами с IC_{50} от 0,3 до 36,2 мкМ. Среди выделенных соединений наибольшую активность ($IC_{50}=0,3$ мкМ) проявляет милтирон, который показывал увеличение аффинитета в присутствии 100 мкМ ГАМК. Милтирон вызывал мышечную релаксацию, седацию, зависимость и абстинентный синдром у мышей в дозах 10–60 мг/кг, эффективных в поведенческом испытании. Следовательно, производные милтирона могут представлять собой новый класс транквилизаторов растительного происхождения [100]. Флавоны гиспидулин (5,7,4'-тригидрокси-3'-метоксифлавоны), выделенный из наземной части шалфея обыкновенного (*Salvia plebeia* R. Br.), обладает агонистической активностью к ГАМК-рецепторам [92].

Карвакрол, присутствующий в эфирном масле чабера садового (*Satureja hortensis* L.), введенный мышам внутрь в дозах 12,5, 25 и 50 мг/кг, проявил в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» анксиолитический эффект, который нивелировался под влиянием антагониста бензодиазепиновых рецепторов

флумазенила. Вместе с тем, карвакрол не проявил седативных или миорелаксирующих свойств и не повлиял на двигательную активность [111, 149].

Анксиолитический эффект экстракта сухого из надземной части схизонепеты многонадрезанной (*Schizonepeta multifida* (L.) Briq.) в большей степени реализуется за счет входящих в его состав эфирного масла и лютеолин-7-О-глюкозида, в меньшей степени – урсоловой кислоты [35].

В качестве основных активных компонентов шлемника байкальского (*Scutellaria baicalensis* Georgi) обычно рассматриваются флавоноиды байкалин и вогонин. Байкалин (7-О-глюкуронид 5,6,7-тригидроксифлавона) в экспериментах на крысах и мышах (7,5– 30 мг/кг) оказывал анксиолитический эффект, но не влиял на двигательную активность мышей [110]. Байкалин взаимодействует предпочтительно с субтипами ГАМК- α -рецепторов, содержащих субъединицы α -2 и α -3, в отличие от бензоадепинов, не обладающих подобной специфичностью [34]. Вогонин (5,7-дигидрокси-8-метоксифлавонон) – главный компонент шлемника байкальского, вызывающий в дозе 7,5–30 мг/кг анксиолиз у самцов мышей в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» [69]. Вогонин проявляет нейропротекторное и анксиолитическое действие и, обладая выраженным сродством к активным бензодиазепиновым центрам ГАМК-эргических рецепторов, ингибирует активацию микроглии [77, 101]

Флавоноиды байкалин и байкалеин считаются главными активными соединениями в траве шлемника бокоцветного (*Scutellaria lateriflora* L.). Байкалеин определен, как лиганд бензодиазепинового рецептора (со слабой аффинностью), и продемонстрировал седативное и анксиолитическое действие, которое осуществляется через ГАМК- α -небензодиазепиновые участки [63, 112]

Kumar D. и др. [96, 97] выделили из травы чистеца тибетского (*Stachys tibetica* Vatke.) флавоноиды и оценили их анксиолитическую активность на крысах линии Wistar. В группе, получавшей апигенин-7-глюкозид, количество входов животных в открытые рукава и продолжительность пребывания в них увеличивались, в то время как эти показатели применительно к закрытым рукавам снижались. Это соединение в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт»

проявило анксиолитический потенциал, сравнимый с эталонными препаратами – апигенином и диазепамом. В тесте на социальное взаимодействие влияние апигенин-7-глюкозида в дозах 25 и 50 мг/кг уменьшало агрессивное поведение крыс-альбиносов, при этом значительно увеличивалось время их социального взаимодействия при ярком свете, в знакомых и незнакомых условиях.

Тимол (монотерпеновый фенол – 2-изопропил-5-метилфенол) – доминирующий компонент эфирного масла тимьяна обыкновенного (*Thymus vulgaris* L.), в дозе 20 мг/кг значительно увеличивает продолжительность пребывания мышей альбиносов линии Swiss в открытых рукавах в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт» [53]

Наиболее часто исследуются флавоноиды, тритерпеновые кислоты (урсоловая и олеаноловая), фенилпропаноиды (розмариновая и кофейные кислоты), терпеноиды и ароматические соединения как компоненты эфирного масла (линалоол, линалил ацетат, тимол, карвакрол и др.), алкалоиды, алкалоидоподобные соединения и иридоиды. Флавоноиды, в большинстве случаев флавоны, способны взаимодействовать с различными зонами ГАМК- α -рецепторов и, благодаря этому, влиять на их функционирование. Выраженные в той или иной степени нейротропные свойства обнаружены у следующих флавонов – гиспидулин (5,7,4)-тригидрокси-6-метоксифлавоны), апигенин (5,7,4)-тригидроксифлавоны), хризоериолол (5,7,4)-тригидрокси-3'-метоксифлавоны), лютеолин (5,7,3',4')-тетрагидроксифлавоны), скутелляреин (5,6,7,4')-тетрагидроксифлавоны), байкалин (7-O-глюкуронид 5,6,7-тригидроксифлавоны), байкалеин (5,6,7-тригидроксифлавоны) и др. Флавоны взаимодействуют с ГАМК- α -рецепторами, как и бензодиазепины – это одни из наиболее часто используемых лекарственных препаратов. Известно, что при взаимодействии с аллостерическими сайтами ГАМК- α , также называемыми бензодиазепиновыми сайтами, увеличивается поступление хлорид-ионов в цитоплазму, повышается тормозной постсинаптический потенциал и снижается возбудимость нейронов. По этому механизму бензодиазепины и флавоны действуют как антиконвульсанты, оказывая седативный, снотворный и анксиолитический эффекты [37]. Кофейная

(3,4-диоксикоричная) кислота в экспериментах на крысах самцах Wistar в дозах 0,5 и 1,0 мг/кг при внутрибрюшинном введении оказывает анксиолитическое действие без изменений локомоторной активности в тестах «открытое поле» и «приподнятый крестообразный лабиринт», а также протективное при повреждениях тканей головного мозга пероксидом водорода (1 и 8,0 мг/кг) [129]. Розмариновая кислота (димер кофейной кислоты) в дозах 2-4 мг/кг обладает анксиолитическим действием, которое при повышении дозы до 8 мг/кг сменяется стимулирующим эффектом. Влияние на долговременную и кратковременную память не обнаружено [99]. Нейротропная активность установлена и для отдельных компонентов эфирных масел. Цитраль при внутрибрюшинном введении оказывает седативное (100 и 200 мг/кг) и миорелаксантное действие (200 мг/кг), в дозах 100 и 200 мг/кг увеличивает продолжительность барбитуратного сна [74]. Цинеол в эксперименте на мышах оказывает противотревожное (400 мг/кг) и антидепрессивное действие (200 и 400 мг/кг), не влияет на двигательную активность, снижает латентность сна, вызванного введением пентобарбитала [72].

Представители данного семейства часто становятся объектами научных исследований, в которых ведется поиск новых седативных, анксиолитических и нейропротекторных средств, при этом большое внимание уделяется как сравнительно хорошо изученным видам растений (например, из родов *Salvia*, *Stachys*, *Thymus*), так и малоизученным родам, включая тропические и субтропические, не представленные во флоре России (*Agastache*, *Clerodendrum*, *Clinopodium*, *Eremostachys*, *Leucas* и др.).

Одними из перспективных видов данного семейства могут рассматриваться растения рода змееголовник (*Dracocephalum* L.) и котовник (*Nepeta* L.)

1.3 Сырьевая база и морфологическая характеристика представителей рода *Dracocephalum* L., *Nepeta* L.

Род *Dracocephalum* L (Lamiaceae) объединяет ценные декоративные и эфиромасличные растения [1]

Первое официальное ботаническое описание змееголовника молдавского было сделано Карлом Линнеем в его «Видах растений» в 1753 году. До конца 1805 года систематикой рода *Dracocephalum* занимался F. Muller, а затем с 1832 по 1884 занимался G. Bentham и эта систематика использовалась до конца XIX века. Б. К. Шишкин предложил систему, которая впоследствии стала наиболее используемой. В систематике Шишкина описана 35 видов рода *Dracocephalum*. Общей принятой системы в настоящее время не существует. Однако А. Л. Буданцевым была составлена одна из последних систем (1987, 1993), которая насчитывает около 70 видов. По этой систематике все виды в состав 3 подродов, 7 секции, 2 подсекций [6, 14, 20, 33].

Большинство видов змееголовника – многолетние травянистые растения; *D. moldavica* L. однолетники; *Dracocephalum fruticulosum* Steph – полукустарничек.

Ареалы змееголовников неравнозначны, от крайне малого (эндем *D. jacutense*) до обширных евразийских (*D. nutans*, *D. ruyschiana*). Два вида *D. palmatum*, *D. stellerianum* распространены на азиатской территории [12].

D. heterophyllum ssp. *ovalifolium* – змееголовник овальнолистный распространен в Средней Азии, Монголии, Северном и Центральном Китае на высоте от 2000 до 5000 м над уровнем моря. На территории России известно единственное местонахождение в Забайкалье в Борзинском районе в окрестностях оз. Зун-Аралтуй. На территории Восточного Забайкалья проходит северная граница распространения. *D. heterophyllum* ssp. *ovalifolium* – ксерофит, произрастает на каменисто-щебнистых склонах гор в степном поясе, на скалах, по каменистым берегам рек и озер, на галечнике [14, 31].

Указано наличие 4 видов змееголовников в бассейне реки Ходжа-бакирган Туркестанского хребта, из которых *D. imberbe* Bunge и *D. diversifolium* Rupr. являются декоративными растениями.

D. nuratavicum встречается в Нуратинских горах на высоте 1200–1300 м над уровнем моря. Растение можно встретить на плоских поверхностях среди кустарников на каменисто-щебенистых почвах в многочисленных ценопопуляциях [1].

Типовой подвид *D. nutans* L. ssp. *nutans* встречается в равнинных местностях: степях, смешанных лесах, на сухих остепненных лугах, песчаных наносах, галечниках по берегам рек, нередко как сорное растение растет близ жилья, по залежам. В Якутии подвид произрастает в центральных, южных, юго-западных районах.

Высокогорные формы, такие как *D. nutans* L. var. *alpinum* Kar.et Kir. и *D. microphyllum* Turcz. растут в лесостепном поясе в горах Алтая и Тянь-Шаня, на Салаирском кряже – низкогорном районе Алтае-Саянской горной системы, на хребте Тункинский в Восточном Саяне и Прибайкальских горах. Подвид *D. nutans* L. ssp. *subarcticum* Kuv. встречается на плато Путорана в высокогорье на альпийских и субальпийских лугах, горных тундрах на высотах 400-900 м над уровнем моря. Вне территории России встречается в гористой части северной Монголии в Прихубсугульской, Хэнтэйской, Хангайской, Монгольско-Даурской флористических районах Монголии [16].

Dracocephalum multicolor Kom. (Lamiaceae) или змееголовник многоцветный, распространен в Приморье.

В Узбекистане встречаются 14 видов данного рода, в том числе, *D. komarovii* Lipsky, *D. adylovii* Maltzev. [1] встречается только в Западном Тянь-Шане, и *D. scrobiculatum* Rgl, *D. nuratavicum* Adylov., *D. heterophyllum* Benth. – только в Памиро-Алае. *D. heterophyllum* Benth., наряду с тем, что встречается в флоре Центральной Азии, зарегистрирован также в Flora Iranica.

Во флоре Западного Тянь-Шаня встречаются 9 видов рода *Dracosephalum* L., их которых 3 вида внесены в «Красную Книгу» Узбекистана: *D. formosum* Gontsch., *D. komarovii* Lipsky., *D. spinulosum* Popov.

Распространённые в Узбекистане виды рода *Dracosephalum* L. встречаются в двух жизненных формах: полукустарничек и многолетнее травянистое растение. Они встречаются в средне-, высокогорных и субальпийских зонах горных территорий республики [1].

D. moldavica – змееголовник молдавский, распространен на Украине, в Белоруссии, Средней Азии, в Европе, Китае, Монголии, Гималаях, где поднимается на высоту до 2700-3100 м над уровнем моря; в Европейской части России, в Западной и Восточной Сибири, на Дальнем Востоке. Встречается в разреженных сухих сосняках, на опушках, в степях [20, 33].

В то же время естественную границу распространения *D. moldavica* установить трудно, так как этот вид издавна культивировался как медоносное и пряноароматическое растение. Можно предполагать первичность восточно-азиатского участка ареала, поскольку в Китае *D. moldavica* произрастает на более «естественных» местообитаниях – на склонах гор, в ущельях, на скалах и по долинам рек, в то время как на западе ареала этот вид приурочен к местам деятельности человека, встречаясь в парках, садах, огородах, иногда как сорное в посевах [2, 33].

Род *Dracosephalum* представлен на территории Якутии 5 видами– *D. jacutense* Peschkova, *D. nutans* L., *D. palmatum* Steph., *D. ruyschiana* L., *D. stellerianum* Hillebr [12, 31].

Dracosephalum jacutense – змееголовник якутский, эндем Центральной Якутии, известен из окрестностей пос. Сангар, отрогов Верхоянского хребта. Обитает на каменисто-щебнистых склонах, осыпях.

D. palmatum – з. дланевидный. Восточно-азиатский вид. В Якутии встречается в северо-восточных районах. Растет на сухих каменисто-щебнистых склонах, скалах, в каменистых тундрах, горных степях. Является компонентом горных степей северо-востока.

D. ruyschiana – з. Руйша. Ареал змееголовника Руйша обширен и простирается от юго-востока Франции до Дальнего Востока. Л.И. Носова характеризует этот вид как лесостепной, так как именно в лесостепной зоне отмечается наиболее значительное количество его находок – к югу и северу от этой зоны он становится более редким. В зауральской части ареала вид обнаруживает большое тяготение к светлым лесам, их полянам и опушкам. Но, в то же время единичные местонахождения змееголовника Руйша отмечены и в настоящих степях Северного Казахстана и Восточной Сибири.

В Якутии змееголовник по долинам рек проникает далеко на север, произрастает в бассейнах рек Лены и Вилюя, где встречается в травяных лиственничных, березовых и смешанных негустых лесах и луговых степях, зарослях кустарников, на остепненных лугах, травянистых склонах, скалах и в долинах рек.

Многие исследователи считают *D. ruyschiana* древним видом. Согласно данным В.Л. Комарова, на Дальнем Востоке распространен близкий к *D. ruyschiana* в систематическом и экологическом отношении *D. argunense* Fischer ex Link. В конце третичного и четвертичном периоде в связи с изменением климата широкое распространение получили светлые леса (лиственничные, сосновые и березовые) и в это время в изменившихся условиях существования на пространстве Восточной Сибири от *D. argunense* образовался новый вид – *D. ruyschiana*. Этот вид в период четвертичных оледенений стал одним из характерных элементов плейстоценового флористического комплекса, в составе которого он расселился далеко на запад.

D. stellerianum – з. Стеллера. Монтанный восточносибирский вид, распространенный в горах северо-востока Сибири, Западных Саянах, на Становом нагорье, на хребтах Яблоновый и Джугджур и на Охотском побережье. В Якутии встречается на Верхоянском хребте, на хр. Черского, на Янском, Оймяконском и Алданском нагорьях, где растет в горных лесах и тундрах, на щебнистых склонах, галечниках горных рек, гольцово-тундровом и подгольцовом поясе, преимущественно на известняках. Известны сборы Г.К. Майделя 1835 г. у г.

Вилуйска. Л.И. Малышев и Г.А. Пешкова высказывают предположение, что *D. stellerianum* произошел от горно-степного вида *D. pinnatum*, обычного в степях Бурятии, на Ольхоне и примыкающей территории Монголии. Похолодание климата в эоплейстоцене сместили *D. pinnatum* в нижний горно-степной пояс, оставив в верхнем поясе отчленившуюся более холодостойкую *D. stellerianum* [12].

Род змееголовник широко распространен на территории Китая. Этот род насчитывает около 60 видов родом из Северного полушария и 32 вида 7 разновидностей встречаются с севера и юго-запада Китая [173].

Змееголовник молдавский – это травянистое растение высотой 15-50 см, для которого характерно слабое опушение всех его частей. Существуют две формы этого растения – синецветковая и белоцветковая. Змееголовник молдавский имеет тонкую корневую систему стержневого типа. В фазу цветения длина главного корня достигает 20-30 см, боковых – 10-15 см.

Стебель змееголовника прямостоячий, на сечении полый, четырёхгранный (в верхней и средней зонах) или округлый (в нижней). Он ветвится у основания, с образованием длинных косонаправленных вверх ветвей. Диаметр стебля в нижней части составляет 6-15 мм, в верхней – 1-2 мм. У синецветковой формы растения окраска стебля антоциановая, у белоцветковой – зеленая.

Листорасположение супротивное. Темно-зеленые листья, сидящие на коротких черешках, имеют дорсовентральное строение и хорошо выраженную центральную жилку. Форма и размеры листьев обеих форм *D. moldavica* зависят от месторасположения на растении. Форма стеблевых листьев продолговато-яйцевидная или продолговато-ланцетовидная, с тупозубчатым краем. Длина листа 2,6-3,3 см, ширина 0,8-1,8 см. Верхушечные листья имеют ланцетовидную форму, прицветные – продолговато-клиновидную.

Голубоватые или сиреневые цветки (15-21 мм) на коротких цветоножках собраны в колосовидное соцветие длиной 16-20 см, состоящее из сближенных ложных мутовок с 5-6 цветками. Чашечка цветка коротковолосистая, двугубая. Цветки змееголовника молдавского обоеполые, т.е. имеют и мужские и женские

органы, опыляются насекомыми. Растение цветёт в июле-августе, причем цветение начинается с нижних бутонов главного побега. Когда зацветает верхний цветок соцветия, нижний отцветает. Наблюдения показали, что период цветения змееголовника длится от 32 до 44 суток. Формула цветка змееголовника молдавского - Ч(5)Л(2,3)Т4П(2).

Плодоносит змееголовник молдавский в августе-сентябре. Плод – ценобий, распадается на 4 трёхгранных, продолговатых орешка длиной 2,4-3,2 мм и шириной 1,2-1,9 мм. Семена бурого, почти чёрного цвета. Масса 1000 семян 2 грамма [2, 31, 32, 33].

Название котовник (*Nepeta* L.) происходит от этрусского города Непет, современное название г. Неппи, в области Римской кампании (Италия), где это растение преобладало [21, 22].

Род *Nepeta* L. насчитывает около 250 видов, распространенных только в Старом свете от Тихого океана (Япония, Корея, Приморский край) до Атлантического (Испания, Марокко, Канарские острова). Огромное большинство видов котовника растет в горах области древнего Средиземноморья от предгорий до альпийского пояса. Леса среднегорного пояса представлены на высоте 1000-1700 над уровнем моря [29, 42].

Nepeta cataria L. (котовник кошачий) – травянистое многолетнее растение высотой 45-100 см. Листья растения длинночерешковые, треугольно-сердцевидные, заостренные, снизу серо-войлочные, с крупными косыми зубцами. Стебель обычный ветвистый, опушен серыми мягкими волосками. Цветки белые или бледно-розовые, неправильные; нижняя губа венчика с пурпуровыми крапинками. Плод состоит из 4 односеменных орешков [3, 29, 28,30]

Nepeta grandiflora Vieb. (к. крупноцветковый) является третичным реликтом, сохранившимся в отдельных местах Евразии. В условиях культурного произрастания котовник крупноцветковый абсолютно неприхотлив. Растение имеет деревянистый плотный корень. В период цветения достигает высоты 150 - 170 см. Листья продолговато-яйцевидные, черешковые, с сердцевидным основанием, острые, городчато-зубчатые. Цветки фиолетово-синие, собраны в

многоцветковые полузонттики, расположенные на концах стебля и верхних пазушных ветвей в виде рыхлых удлинённых кистей, совокупность которых образует общее метельчатое соцветие. В условиях культуры цветет в первый год с августа до конца сентября. На второй и последующие годы вегетации зацветает в июне. Сбор семян проводится в первой половине августа. Плодоносит обильно. Надземная часть растения имеет приятный аромат [3, 28].

На лесных полянах и опушках, а также среди кустарников встречаются *N. rannonica* L., *N. somkhetica* Kapell. Выше лесного пояса господствуют травянистые сообщества субальпийского характера. Часто здесь наблюдаются элементы альпийских лугов в сочетании элементов верхнего лесного пояса. Среди этих сообществ распространены *N. grandiflora* Vieb., *N. somkhetica* Kapell., *N. zangezura* Grossh. На скалистых склонах, на расщелинах скал, каменистых россыпях субальпийского пояса обитает *N. buschii* Sosn. et Mand.

В районах Большого Кавказа распространены 11 видов котовника. Такие виды как *Nepeta cataria* L., *N. supina* Stev., *N. cyanea* Stev., *N. dagestanica* Pojark., *N. longituba* Pojark., *N. lamiifolia* Willd. встречаются только во флоре Большого Кавказа (в пределах Азербайджанской Республики). В целом флора Большого Кавказа характеризуется наличием большинства видов, свойственных этому региону. В Талыше распространены сравнительно меньшее число видов котовника – всего 7. В этом регионе виды котовника произрастают как в равнинных и предгорных, среднегорных и высокогорных поясах. Нагорно-ксерофитная растительность в Талыше имеет распространение во всех горных поясах: в нижнем, среднем, верхнем. Большое развитие имеет эта растительность в Зуванде. Растительность Зуванда имеет резкое отличие от других частей Талыша. Здесь развита и лугово-степная растительность. В составе этой растительности нередко обитают *Nepeta buhsei* Pojark., *N. betonicifolia* С.А.Меу., на открытых щебнистых и каменистых склонах. Первый вид и является аборигеном флоры Талыша. Довольно редко и рассеянно произрастают виды котовника в Кура-Араксинской низменности, в Кобыстане и Степном нагорье. По данным флоры Азербайджана имеются редкие гербарные образцы *N. cataria* L.

(Кура-Араксинская низменность), *N. meyeri* Benth. (Степное Платогорье), *N. amoena* Stapf (Кобыстан, Кура-Араксинская низменность), *N. schischkinii* Pojark. (Кобыстан) [27]

Согласно литературным данным виды котовника имеют свои особенности распространения в природе Дагестана.

К. Биберштейна (*N. biebersteiniana* (Trautv.) Pojark.) – произрастает в среднем и нижнем поясе гор, по открытым щебнистым и горным склонам и в горно-степных группировках Ахтынского, Буйнакского, Курахского районов и Бежтинского участка, является эндемиком Дагестана. К. Дагестанский (*N. daghestanica* Pojark.) – встречается в среднем горном поясе по открытым склонам, на щебнистых осыпях и обрывах Ахтынского, Курахского, Цумадинского, Докузпаринского районов и Бежтинского участка, является эндемиком Дагестана.

К. венгерский (*N. pannonica* L.) растет в степном поясе на лугах, в степях, в зарослях кустарников, по лесным опушкам, на открытых склонах; в горных областях в нижнем и среднем поясах на луговых и степных склонах Ахтынского, Буйнакского районов.

К. закавказский (*N. transcaucasica* Grossh.) встречается в среднем горном поясе на каменистых склонах Ахтынского района, является эндемиком Дагестана.

К. кошачий (*N. cataria* L.) растет в среднегорном поясе на лугах, по опушкам, в зарослях кустарников, по берегам рек Ахтынского района.

К. крупноцветковый (*N. grandiflora* Vieb.) встречается в среднем и верхнем горном поясе на лугах и высокотравье, реже – в лесном поясе по опушкам и полянам, на лугово-степных склонах Агульского, Ахтынского, Ботлихского, Гунибского, Докузпаринского, Курахского районов и Бежтинского участка. К. лежащий (*N. supina* Stev.) произрастает в альпийском поясе на осыпях, в моренах, галечниках, в трещинах скал Докузпаринского, Цумадинского районов и Бежтинского участка, является эндемиком Дагестана. К. мелкоцветковый (*N. parviflora* Vieb.) произрастает в нижнем горном поясе на сухих степных склонах, на песчаных буграх, на барханах, на засоленных почвах Ахтынского, Буйнакского районов. К. прелестный (*N. amoena* Stapf) растет в нижнем горном поясе на сухих

склонах, на открытых каменистых щебнистых и песчаных склонах, на осыпях Ахтынского района. К. кистевидный (*N. racemosa* Lam.) растет на каменистых склонах Ахтынского района. К. синий (*N. cyanea* Stev.) встречается в среднем и верхнем горном поясах на сухих склонах и осыпях Агульского, Гунибского, Курахского, Чародинского и Шамильского районов, является эндемиком Дагестана. К. яснотколистый (*N. lamifolia* Willd.) произрастает в среднегорном поясе на сухих склонах и осыпях Докузпаринского района, является эндемиком Дагестана [23].

1.4 Химический состав растений рода *Dracocephalum* L., *Nepeta* L.

Из всех частей растений представителей рода *Dracocephalum* L. были идентифицированы терпеноиды, стероиды, флавоноиды, алкалоиды, лигнаны, фенилпропаноиды, кумарины и цианогенные гликозиды [7, 173]. Наиболее специфичными для рода *Dracocephalum* являются флавоноидные соединения – производные апигенина и лютеолина с замещением в положении 5,7,4' и 5,7,3', 4', которые преобладают во многих исследованных видах *Dracocephalum*, что является важным хемосистемным признаком для этого рода. Считается, что розмариновая кислота является специфическим маркером семейства *Lamiaceae*, но она обнаружена ни во всех видах *Dracocephalum*. Следует отметить, что кофейная кислота и ее производные всегда присутствуют в экстрактах рода *Dracocephalum* [126].

В исследовании Wang S.-Q. и др. из надземной части *Dracocephalum tanguticum* (сырье заготовлено в провинции Цинхай Китайской Народной Республики) выделены два флавоноида ладанетин-6-О-β-(6"-О-ацетил) глюкозид (1) и педалитин-3' -О-β-глюкозид и другие соединения (нарингенин, 7-О-метилсеутеллареин, эридиктиол, лютеолин, тилианин) [166]. В другом исследовании из растения *Dracocephalum tanguticum* (сырье заготовлено в Тибете, Китай) выделели гликозиды лютеолин-7-метокси-3'-О-(3"-О-ацетил)-β-D-глюкопиранурановая кислота-6"- метиловый эфир, бензил-6 - [(2E) -2- бутеноат] -

β -D-глюкопиранозид, 2-метокси-4- (2-пропен-1-ил) пенил-6-ацетат- β -D-глюкопиранозид и 2-метокси-4- (2-пропен-1-ил) пенил-6 - [(2E) -2-бутеноат] - β -D-глюкопиранозид, бензил- β -D-глюкопиранозидом, 2-метокси-4- (2-пропен-1-ил) пенил- β -D-глюкопиранозид и пектоларигенин [174].

Dracosephalum palmatum Stephan - лекарственное растение, используемое в якутской народной медицине. Из неочищенного этанольного экстракта надземных частей этого растения (сырье заготовлено в окрестностях села Томтор Оймяконском улусе Республики Саха Российской Федерации) было выделено 23 соединения (фенилпропаноиды, кумарины, флавоноиды и тритерпены). Среди них обнаружено восемь соединений (сальвианоловая кислота В, кафтаровая кислота, цикориевая кислота, умбеллиферон, эскулетин, апигенин-7-O- β -D-глюкуронопиранозид, изорхоифолин и лютеолин-4'-O- β -D-глюкопиранозид) впервые в роду *Dracosephalum* [126]. При фитохимических исследованиях надземной части *Dracosephalum palmatum* (сырье заготовлено в окрестностях села Томтор Оймяконском улусе Республики Саха Российской Федерации) выделен флавоноид дракопальмазид, который идентифицирован на основе спектральных данных УФ, МС и ЯМР как лютеолин-7,4'-ди-O- α -L-рамнопиранозил- (1 \rightarrow 6) - β -D-глюкопиранозид (лютеолин-7,4'-ди-O-рутинозид) и еще два известных соединения – цинаротризид (лютеолин 7-O-рутинозид-4-O-глюкозид, 2) и лютеолин-7,4-ди-O-глюкозид [125]. Также выделены два гликозида эриодиктиола из надземной части *Dracosephalum palmatum* и идентифицированы с использованием УФ, ЯМР и CD спектроскопии и масс-спектрометрии как (S) -эриодиктиол-7-O- (6"-O-малонил) - β - глюкопиранозид (пиракантозид-6"- O-малонат, 1) и (S) -эриодиктиол-7-O- (4"- O-малонил) - β -D-глюкопиранозид (пиракантозид-4"- O-малонат, 2) [127].

В работе Wang L. и др. химическое исследование надземных частей *Dracosephalum heterophyllum* (сырье заготовлено в провинции Цинхай Китайской Народной Республики) привело к выделению фенольных алкалоидов, включая два флавоноидальных алкалоида, драгебефины А и В, один имидазольный алкалоид с фенольным заместителем драгебенином, а также 15 других известных

соединений. Их структура была установлена с помощью обширного спектрального анализа данных. Из-за стереогенного центра в кольце пирролидин-2-она флавоноидальные алкалоиды являются хиральными, хотя они были выделены в виде рацематов. Энантиомеры разделяли с помощью ВЭЖХ с использованием хиральной фазы и стереохимически характеризовали с помощью спектроскопии кругового дихроизма. Структура соединения драгебенина была установлена методом рентгеновской кристаллографии [163]. Из надземной части также *D. heterophyllum* выделили диосметин-7-О-глюкозид, диосметин-7-О-рутинозид, олеаноловую кислоту, стигмастерол, β -ситостерол, β -ситостерол глюкопиранозид, кверцетин, кемпферол [124].

Наиболее подробно изучено эфирное масло *D. moldavica* в его составе обнаружили цитраль (25-50 %), гераниол (около 30 %) нерол (около 7 %) цитронеллол (около 4 %) альдегид (0,43 %) тимол (0,23 %), лимонен и моноциклический сесквитерпен [33]. В исследовании Dastmalchi представлен химический состав водного экстракта змееголовника молдавского (сырье заготовлено в Тегеране, Иран). Экстракт содержит фенольные соединения, включая гидроксикоричные кислоты (розмариновая кислота) и флавоноиды (лютеолин-7-О-глюкозид, лютеолин и апигенин) идентифицированные по их хроматографическому поведению и спектральным характеристикам. [62]. Из надземной части змееголовника молдавского (сырье заготовлено в Китайской Народной Республике) выделены новый тетрамер кофейной кислоты, названный (+) метил рабдосин (4), вместе с семью известными мультимерами кофейной кислоты и один мономер кофейной кислоты. Структуры этих соединений подтверждены на основе одномерной (1D) и двумерной (2D) ЯМР-спектроскопией и масс-спектрометрическим анализом. Восемь соединений были определены как (-) рабдосин (1) (+) рабдосин (2), розмариновая кислота (3), метилрозмаринат (5), (+) натрий рабдосин (6), сальвияфлазид (7), натрия-розмаринат (8), (+) даншензу (9) [175]. В фитохимическом исследовании M. Martínez-Vázquez и др. органических экстрактов надземной части *Dracosephalum moldavica* (сырье заготовлено в Сан-Хосе-Тлакотитлан, Озумба, Мексика)

привело к выделению и обнаружению акацетина, апигенина, педункулина и лютеолина, а также четырех флавоновых гликозидов: тилианин, агастахозид, акацетин 7- β -D-O-(2"-ацетил) глюкозид. Четыре соединения терпеноидного вида: смесь β -ситостерол и стигмастерола, смесь олеаноловой и урсоловой кислоты и глюкозид ситостерола: ситостерол-3- β -O-глюкозид, даукостерол. Из метанольного экстракта выделены в значительном количестве глюкоза и сахароза, а также феруловая кислота. Водный экстракт надземной части змееголовника молдавского состоит из доминирующих компонентов: акацетин 7-O- β -D-(6"-O-малонил)-глюкозид, лютеолин 7-O- β -D-(6"-O-малонил)-глюкозид, и апигенин 7-O- β -D-(6"-O-малонил)-глюкозид, и акацетин 7- β -D –глюкуронид, 8-гидрокси-сальвигенин, диосметин, гарденин А, 6- β -O-малонил-арбутин [109]. Из надземной части змееголовника молдавского (сырье заготовлено в Синьцзян-Уйгурском автономном районе Китая) выделено 31 соединение флавоноидной природы: кемпферол, кверцетин, эскулетин, диосметин, акацетин, апигенин, лютеолин, цирцимаритин, сальвигенин, сантафлавоин, агастахозид, акацетин-7-O- β -D-глюкозид, диосметин-7-O-неогесперидозид, акацетин-7-O-неогесперидозид, лютеолин-7-O-неогесперидозид, лютеолин-7-O- β -D-глюкозид, апигенин-7-O- β -D-глюкозид, лютеолин-7-O- β -D-глюкуронид, апигенин-7-O- β -D-глюкуронид, диосметин-7-O- β -D-глюкуронид, акацетин-7-O- β -D-глюкуронид, гесперидин, гиперозид, дигидрокверцетин, цинарозид, тилианин, кемпферол, линарин, нарингенин, хризоэриол, гарденин В, 6-малонил-арбутин, скрофулеин, танакин-8-O- β -D-глюкопиранозид, изорамнетин [172].

В 70% водно-спиртовом экстракте надземной части змееголовника молдавского (сырье из коллекции Центрального ботанического сада Национальной академии наук Беларуси) (после удаления экстрагента) методом ВЭЖХ-МС идентифицировали порядка 9 компонентов. Доминирующим компонентом является розмариновая кислота, а также флавоноид - лютеолин-7-O-глюкуронид [18].

Из змееголовника молдавского выделили 3 флавоноида: кемпферол, хризоэриол и кверцетин [150]. Апигенин, лютеолин, кемпферол, изорамнетин,

тилианин, агастахозид, акацетин-7-О-(6-О-малонил-β-D-глюкопиразид) и синрингарезинол были выделены из надземной части змееголовника молдавского (сырье заготовлено в в Тыргу-Муреш / Марошвазареи Трансильвания, Румыния) с использованием колоночной хроматографии с полистирольной смолой RA, полиамидом и силикагелем, а структуры соединений были идентифицированы с помощью спектральных данных. Исследования показали, что экстракты цветков *D. moldavica* содержат также антоцианы: дельфинидин, цианидин и пеларгонидин. Цианидин и пеларгонидин были идентифицированы впервые у этого вида [90]. В результате химического исследования из надземной части змееголовника молдавского (сырье заготовлено в Синьцзян-Уйгурском автономном районе Китая) выделили 1 новое и 15 известных соединений. На основе спектроскопических анализов новое соединение было определено как флавоноидный гликозид акацетин -7-0-(4"-ацетил) – глюкопиранозид. Шестнадцать известных соединений идентифицированы как акацетин-7-О-(6"-ацетил)-глюкопиранозид, акацетин-7-О-(3"-ацетил)-глюкопиранозид, гарденин В, сальвигенин, скрофулеин, кемпферол-3-О-глюкопиранозид, кемпферол-7-О-глюкопиранозид, кверцетин-3-О-глюкопиранозид, кверцетин-3-О-галактопиранозид, метил розмаринат, этил розмаринат, уваол, 23-гидроксиурсоловая кислота, бетулин и бетулиновая кислота [170].

В эфирном масле надземной части *Dracosephalum nutans* (сырье заготовлено в Казахстане) определено 44 компонента, преобладающими являются 1Н – циклопроп [ε] азулен – 7 – ол, декагидро – 1,1,7 – триметил – 4 – метилен–(14,23 %), кариофиллен оксид (11,3%) [51]. Исследовано эфирное масло *Dracosephalum nutans* L. (Lamiaceae). ГХ-МС - анализ масла показал наличие около 25 монотерпеноидов, включая пинокампфон (56,4%), β-пинен (12,7%), изопинокампфон (4,3%), α-фелландрен (4,6%) и изопинокамфеол (3,7%) [115].

В эфирном масле *Dracosephalum kotschyi* 38 компонентов. Основными компонентами являются лимонен, перилловый альдегид, метилгеранат [117]. Анализ ГХ/МС показал, что в состав эфирного масла *Dracosephalum kotschyi* входят основные компоненты - это гераниаль (35,8%), C₁₀H₁₄O (лимонен-10-аль)

(26,6%), лимонен (15,8%) и 1,1-диметоксидекан (14,5%) [139]. Компонентный состав эфирного масла из надземных частей *Dracocephalum kotschyi* исследован с помощью ГХ и ГХ/МС. Основными компонентами были α -пинен, оксид кариофиллена, терпинен-4-ол и гермакрен D [85]. Из растения *Dracocephalum komarovi* (сырье заготовлено в Кумышкане, Узбекистан) были выделены дитерпены комаровихинон, дракоцефалон А, 20-норабиетан [160].

Из этилацетатного извлечения *Dracocephalum peregrinum* выделили 3 флавоноидных гликозида акацетина перегринумин А (акацетин-7-О- (2,3-О-диацетил- α -L-рамнозил) - (1 \rightarrow 6) - β -D-глюкозид), перегринумин В (акацетин-7-О- (2,4-О-диацетил- α -L-рамнозил) - (1 \rightarrow 6) - β -D-глюкозид), перегринумин С (акацетин-7-О- (3,4-О-диацетил- α -L-рамнозил) - (1 \rightarrow 6) - β -D-глюкозид) и 1 один новый цианогенный гликозид перегринумсин А ((2R) - β -D- (6-О-ацетил) - глюкозил-2-фенилацетонитрил) [68].

Из экстракта надземных частей *Dracocephalum rupestre* выделили дракорупезины А и В. Они были охарактеризованы как две диастереомерные пары энантиомеров с помощью хиральной высокоэффективной жидкостной хроматографии и кругового дихроизма (HPLC-CD) [134]. Фитохимические исследования надземных частей *Dracocephalum rupestre* привели к выделению четырех групп флавоноидных алкалоидов - дракоцефинов А – D [136].

Растения рода *Nepeta* содержат соединения, относящиеся к вторичным метаболитам, такие как монотерпены (иридоиды и их гликозиды), дитерпены, тритерпены, а также фенольные соединения, включая флавоноиды. Наиболее распространенными метаболитами являются иридоидные монотерпены – непеталактоны, которые представляют бициклические монотерпены, состоящие из конденсированных колец циклопентана и лактона [151]. Непеталактон был впервые выделен McElvain и соавторами в 1941 году. Структуру этого соединения установил в 1954 году Jerrold Meinwald путем восстановительного расщепления [89]. Идентифицированные и охарактеризованные непеталактоны в роде *Nepeta* являются 4 α , 7 α , 7 α -непеталактон; 4 α , 7 α , 7 β -непеталактон; 4 α , 7 α , 7 β -непеталактон; 4 α , 7 α , 7 α -непеталактон; 4 α , 7 β , 7 β -непеталактон; и 4 α , 7 β , 7 α -

непеталактон. Непеталактоны также присутствуют в виде гидрогенизированных производных, таких как α -дигидронепеталактон, β -дигидронепеталактон, 5,9-дегидронепеталактон, непеталовая кислота, иридомирмецин и изоиридомирмецин.

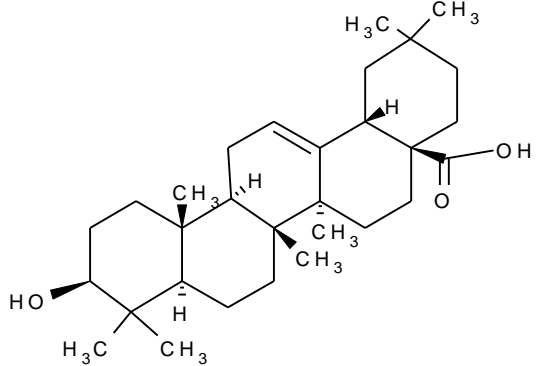
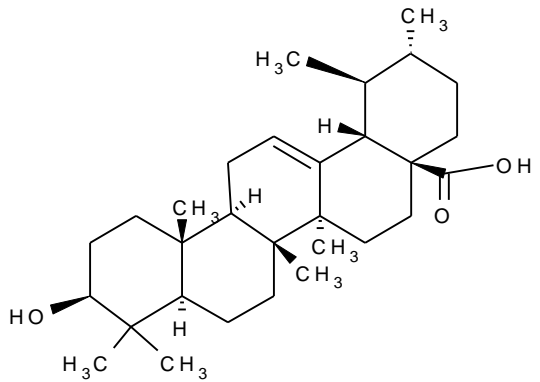
Другие обнаруженные монотерпены в роде *Nepeta* – это иридоидные гликозиды такие как 1,5,9-эпидезоксилогановая кислота, непетариазид, непетазид, велпетин, иксорозид, аюгол, аукубин, непетанудозиды А-D, монотерпеновые γ -лактоны, циклопентанмонотерпеновые енольные ацетаты (такие как иридодиальный β -моноенольный ацетат, дигидроиридодиальный диацетат, иридодиальный диеноловый диацетат), монотерпеновый алкалоид (актинидин) и циклопентановые монотерпены (арголиновая кислота А и метиловый эфир арголиновой кислоты В). Урсоловая кислота – это наиболее распространенный тритерпен, идентифицированный в роде *Nepeta*, присутствующий в нескольких растениях с последующим скелетом типа лупана и олеанола в качестве непектина, олеаноловой кислоты, лупеола, бетулина, непехинола и тритерпены непеталовой кислоты, такие как дигидро-3 α - (β -ситостерил-3 β -окси) непеталактон и дигидро-3 α (олеан-12ен28оил-3 β окси) непеталактон [67]. Химическое исследование эфирного масла рода *Nepeta* показало увеличенный состав непеталактонов во время цветения. Непеталактоны, 1, 8-цинеол, α -пинен, α -терпинеол, оксид кариофиллена обнаруживаются почти во всех изучаемых видах рода *Nepeta* [67, 70]

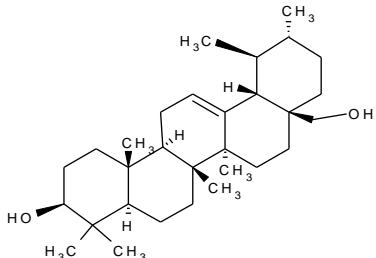
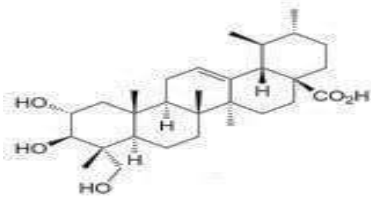
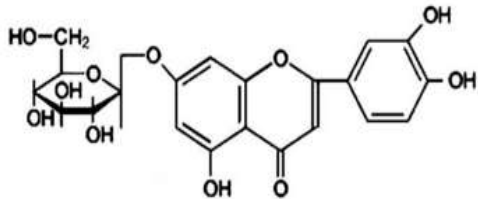
Различные виды флавоноидов были выделены из *Nepeta*, включая флавоны, флавонолы, флаванололы и флаваноны. Кроме того, флавоны *Nepeta* (цирсимаритин, 8-гидроксицирсимаритин, сальвигенин, 8-гидроксисальвигенин и 8-гидроксицирсиллол) обычно используют в качестве характерной хемотаксической особенностью рода [83]. Некоторые флавоноиды присутствуют только у немногих видов и кажутся случайным образом распределенными, тогда как другие гораздо более распространены и выделены у многих видов, относящихся к роду *Nepeta*, такие как цирсимаритин, изотимусин и генкванин. Другими часто идентифицируемыми флавонами являются, апигенин, лютеолин,

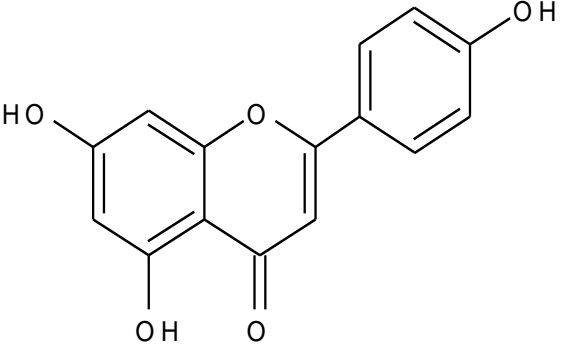
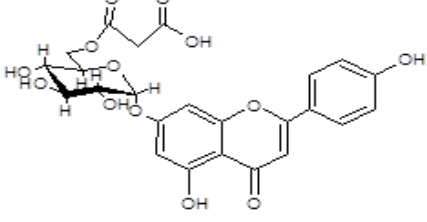
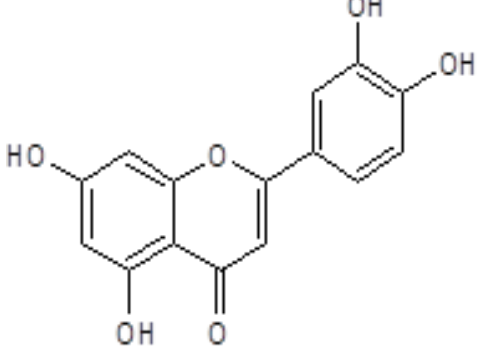
сальвигенин, 8-гидроксисальвигенин, ксантомикрол, ладанин, цирсилиол, skutellarin A и нефроцизин, тогда как лютеолин 7-O- β -D-глюкуронид, лютеолин 7-O-глюкуроно- (1 \rightarrow 6) -глюкозид, норнепетин, непетин, непетин 7-глюкуронид, непеприн, гиспидулин 7-глюкозид, гиспидулин 7-O- β -D-глюкуронид, ладанин, гарденин B, тимозин, акацетин и сальвитин были идентифицированы только в немногих или отдельных видов рода *Nepeta*. Флавонолы характеризуются наличием агликонов кемпферола и кверцетина и их производных (кемпферол 3-O- β -D-глюкопиранозид, кемпферол 3-O- α -рамнозид, кемпферол 3-O- β -D-рутинозид, гемкозид 3-O-рамнозид -4'- O- кемпферола, кверцетин 3-O- β -D-рутинозид, 3,6,3'-триметилкверцетагетин и 3,6,7,3',4'-пентаметилкверцетэгетин. Кроме того, фенольные компоненты хорошо представлены в роде *Nepeta* с идентификацией более 20 производных. Среди них наиболее часто встречающиеся фенолкарбоновые кислоты (галловая кислота, 4-гидроксibenзойная кислота), фенилпропаноиды (феруловая кислота, п-кумаровая кислота, кофейная кислота, розмариновая кислота, 2,3-дигидро-2-гидроксикофейная кислота, этилрозмаринат, кофеилтартроновая кислота, хлорогеновая кислота, кониферин, эвгенил-D-глюкопиранозид, эвгенил-O- β -апиофуранозил- (1 \rightarrow 6) -O- β -глюкопиранозид, ларицирезинол 4'-O- β -D-глюкопиранозид, непетоидин A и непетоидин B), жирно-ароматические гидроксикислоты (3,4-дигидроксиметиловый эфир миндальной кислоты) [141, 144, 145, 152].

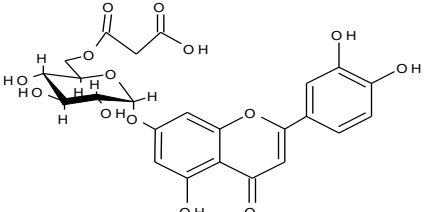
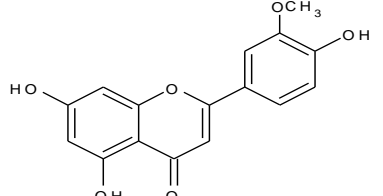
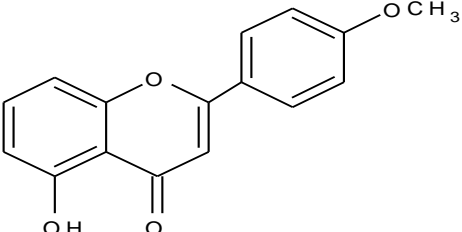
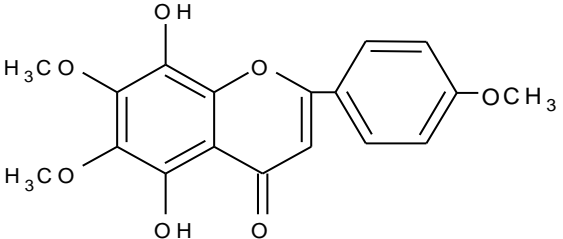
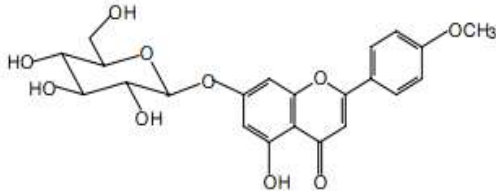
Химический состав представителей рода *Dracocephalum* L и *Nepeta* L. Представлен в таблице 1

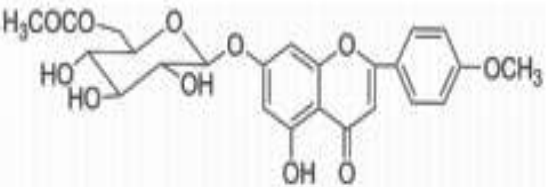
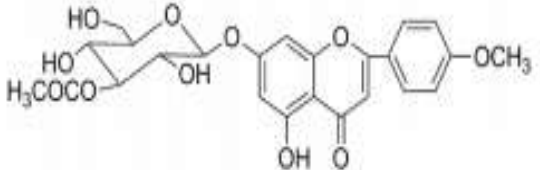
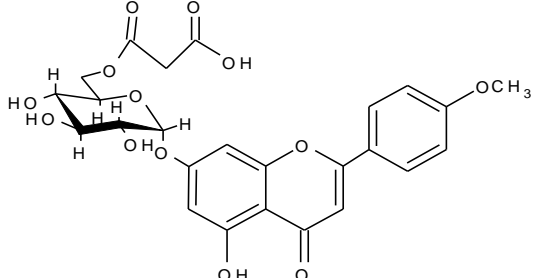
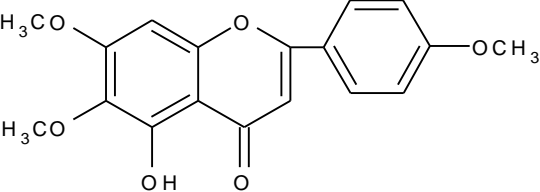
Таблица 1. Химический состав различных видов рода *Dracocephalum* L. и рода *Nepeta* L.

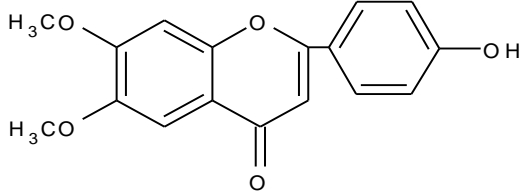
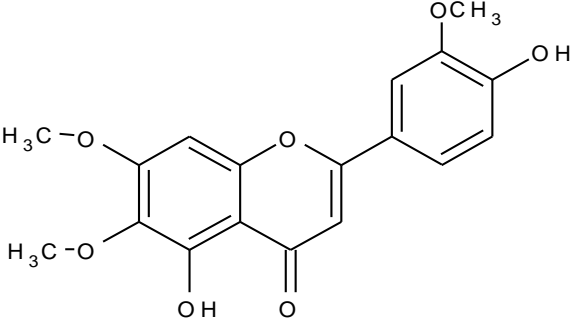
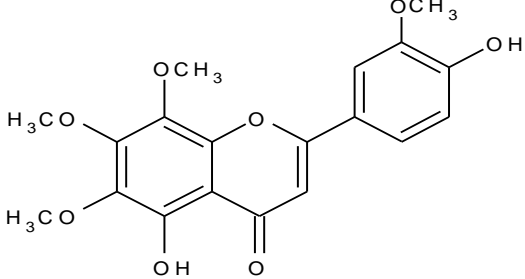
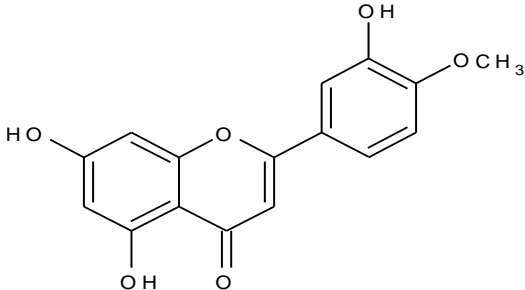
№п/п	Название соединения	Структурная формула	Производящее растение	Ссылка на источник
1.				
<i>Трипертеноиды</i>				
1.	Олеаноловая кислота		<i>Dracocephalum tanguticum</i> <i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Dracocephalum kotschyi</i> <i>Dracocephalum forrestii</i> <i>Dracocephalum peregrinum</i> <i>Dracocephalum rupestre</i> <i>Dracocephalum palmatum</i> <i>Nepeta caesarea</i> <i>Nepeta cataria</i> <i>Nepeta faassenii</i> <i>Nepeta grandiflora</i> <i>Nepeta juncea</i>	[88, 176, 178] [84] [140] [102, 103] [84] [84] [126] [67, 145] [84] [84] [84] [84]
2.	Урсоловая кислота		<i>Dracocephalum tanguticum</i> <i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Dracocephalum kotschyi</i> <i>Dracocephalum rupestre</i> <i>Dracocephalum forrestii</i> <i>Nepeta cataria</i> <i>Nepeta cataria</i> l. var. <i>citriodora</i> <i>Nepeta eriostachya</i> <i>Nepeta faassenii</i> <i>Nepeta grandiflora</i> <i>Nepeta clarkei</i> <i>Nepeta juncea</i>	[176, 178] [173, [140] [173] [173] [103] [94] [54] [84] [84] [82] [78]

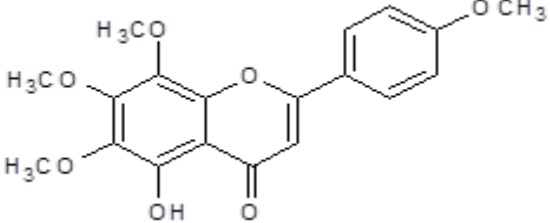
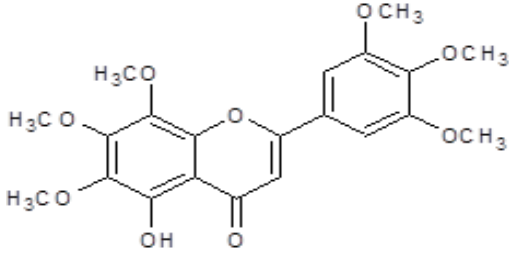
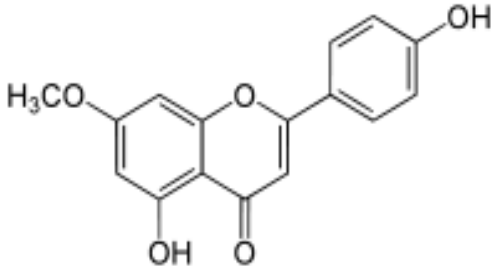
3.	Уваол		<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Nepeta aragonensis</i> <i>Nepeta teydea</i>	[173] [145] [145]
4.	2 α , 3 β , 23-тригидроксиурс-12-ен-28-овая кислота		<i>Nepeta hindostana</i> <i>Nepeta prattii</i>	[46] [67]
Флавоны				
5.	Лютеолин-7-О-глюкозид (цинарозид)		<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Dracocephalum palmatum</i> <i>Nepeta cataria</i>	[67] [126] [19, 39]

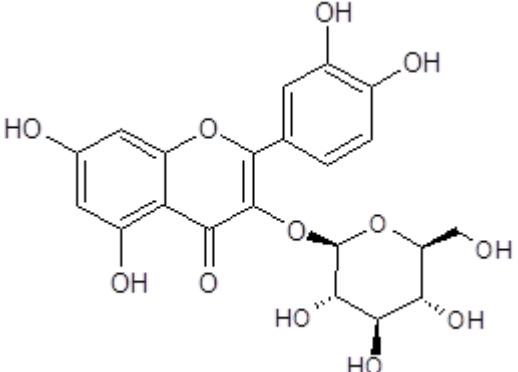
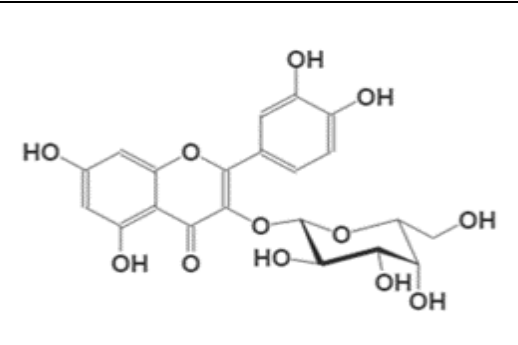
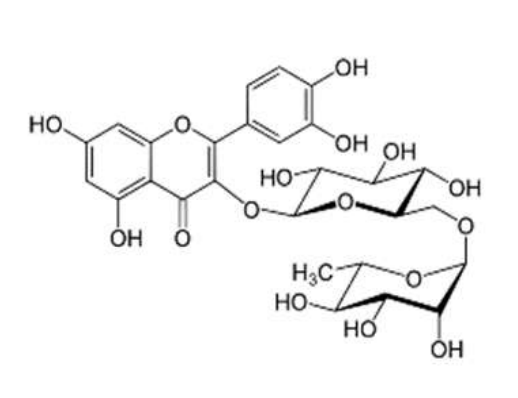
6.	Апигенин		<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Dracocephalum rupestre</i> <i>Dracocephalum kotschyi</i> <i>Nepeta cataria</i> <i>Nepeta asterotricha</i> <i>Nepeta cataria ssp. citriodora</i> <i>Nepeta crispa</i> <i>Nepeta ispahanica</i> <i>Nepeta microsiphom</i> <i>Nepeta mussinii</i> <i>Nepeta transcaucasica</i>	[62, 109, 90] [135] [65, 71] [19, 39, 114] [145] [116] [145] [145] [145] [145] [145]
7.	Апигенин -7-О-β-D-(6''-О-малонил) глюкозид		<i>Dracocephalum moldavica</i>	[109]
8.	Лютеолин		<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Dracocephalum rupestre</i> <i>Dracocephalum forrestii</i> <i>Dracocephalum peregrinum</i> <i>Dracocephalum kotschyi</i> <i>Nepeta asterotricha</i> <i>Nepeta cataria</i> <i>Nepeta cataria ssp. citriodora</i> <i>Nepeta daenensis</i> <i>Nepeta schiraziana</i> <i>Nepeta sibthorpii</i>	[62, 90, 173] [135] [103] [61] [65, 71] [19, 145, 39] [114, 145] [116, 145] [145] [145] [145]

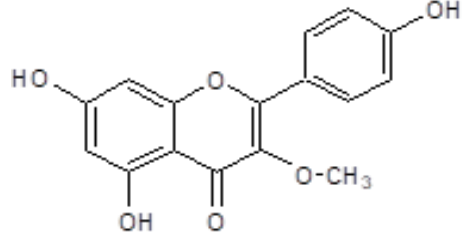
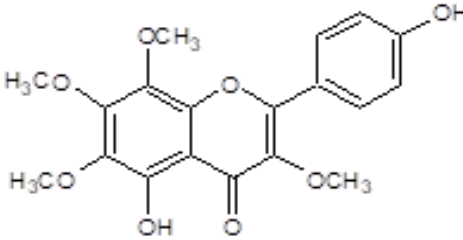
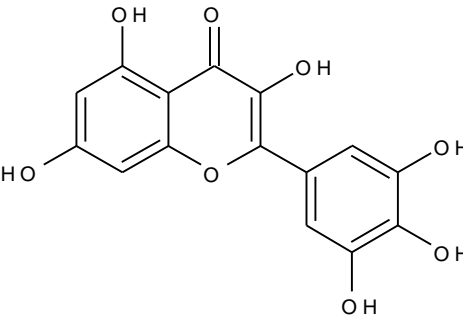
9.	Лютеолин -7-О-β-D-(6''-О-малонил) глюкозид		<i>Dracocephalum moldavica</i>	[109]
10.	Хризозеариол		<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Nepeta cataria</i> <i>Nepeta clarkei</i>	[150, 170] [19] [78]
11.	Акацетин		<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Nepeta spathulifera</i> <i>Nepeta cataria</i> <i>Nepeta grandiflora</i>	[109] [67, 145] [17, 67, 145] [67, 145]
12.	Педункулин (8-гидрокси-сальвигенин)		<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Nepeta crispa</i> <i>Nepeta grandiflora</i> <i>Nepeta isaurica</i> <i>Nepeta nuda</i> <i>Nepeta pogonosperma</i> <i>Nepeta saturejoides</i>	[109] [145] [145] [145] [145] [145] [145]
13.	Тилианин (акацетин 7-О-β,D-глюкозид)		<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Dracocrphalum kotschyi</i> <i>Nepeta cataria</i>	[109] [71] [19]

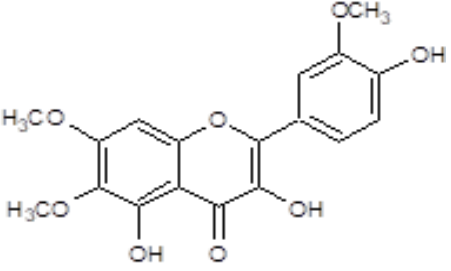
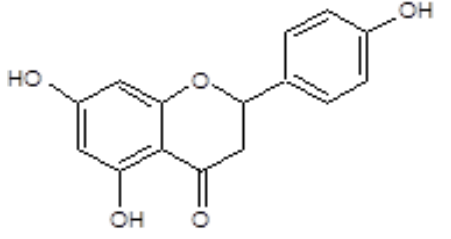
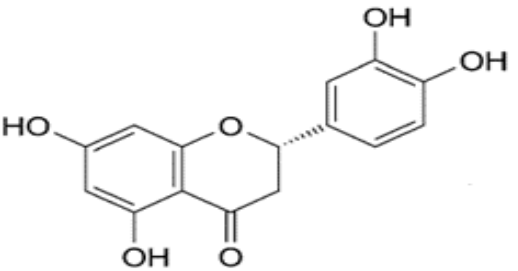
14.	Акацетин-7-О- (4''-ацетил)- глюкопиранозид		<i>Dracocephalum moldavica</i>	[170]
15.	Акацетин-7-О-(3''-ацетил)-глюкопиранозид		<i>Dracocephalum moldavica</i>	[170]
16.	Акацетин-7-О-β-D-(6''-О-малонил) глюкозид		<i>Dracocephalum moldavica</i>	[109]
17.	Сальвигенин		<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Nepeta assurgens</i> <i>Nepeta asterotricha</i> <i>Nepeta nuda</i> <i>Nepeta pungens</i> <i>Nepeta cataria</i> <i>Nepeta transcaucasica</i>	[170] [145] [145] [145] [145] [19, 145] [145]

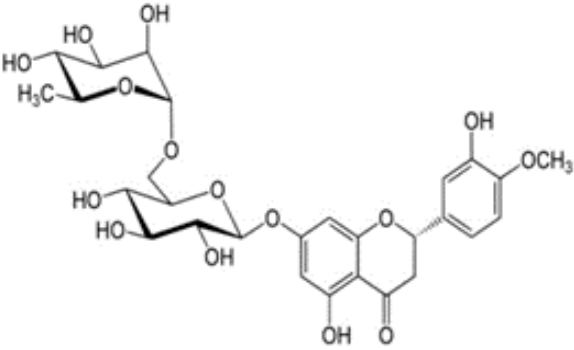
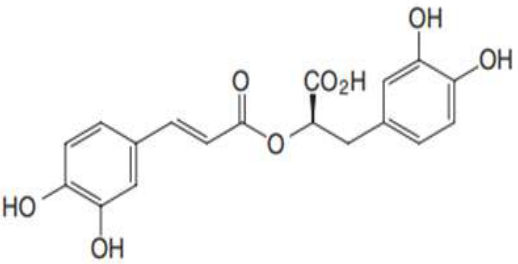
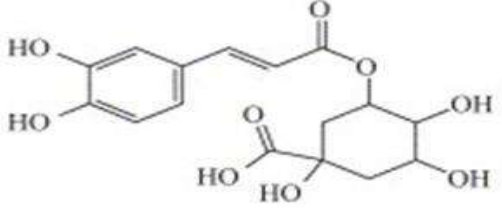
18.	Скрофулеин		<i>Dracocephalum moldavica</i>	[170]
19.	Цирсимаритин (6-метокси-7-метилапигенин)		<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Dracocephalum kotschyii</i> <i>Nepeta cataria</i> <i>Nepeta crassifolia</i> <i>Nepeta crispa</i> <i>Nepeta gloeocephala</i> <i>Nepeta glomerulosa</i> <i>Nepeta grandiflora</i> <i>Nepeta mussinii</i>	[172] [65] [19, 145] [145] [145] [145] [145] [145] [145]
20.	Ксантомикрол		<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Dracocephalum kotschyii</i> <i>Nepeta denudate</i> <i>Nepeta glomerulosa</i> <i>Nepeta transcaucasica</i> <i>Nepeta cataria</i>	[90] [65, 71] [145] [145] [145] [19, 145]
21.	Диосметин		<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Dracocephalum peregrinum</i>	[172] [61]

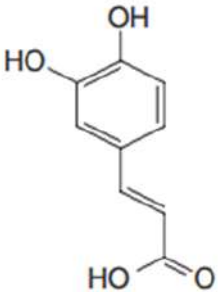
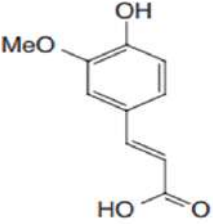
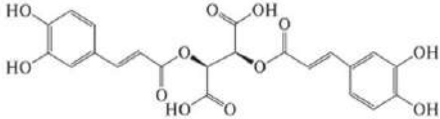
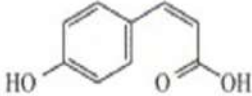
22.	Гарденин В		<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Nepeta transcaucasica</i> <i>Nepeta cataria</i>	[170] [145] [19, 145]
23.	Гарденин А		<i>Dracocephalum moldavica</i>	[109]
24.	Генкванин (7-О-Метилапигенин)		<i>Nepeta amoena</i> <i>Nepeta asterotricha</i> <i>Nepeta bucharica</i> <i>Nepeta cataria</i> <i>Nepeta crispa</i> <i>Nepeta glomerulosa</i> <i>Nepeta grandiflora</i> <i>Nepeta septemcrenata</i>	[145] [145] [145] [19, 145] [145] [145] [145] [93, 145]

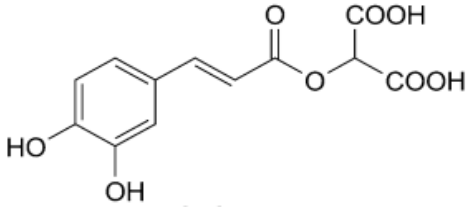
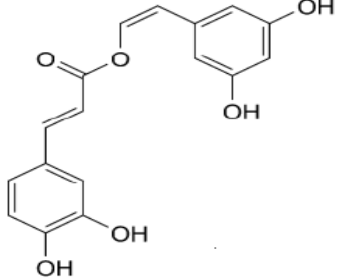
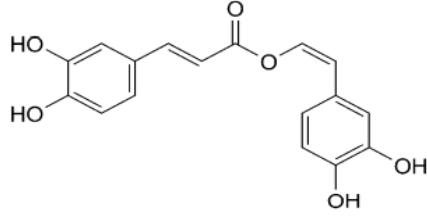
31.	Кверцетин-3-О- глюкопиранозид	 <p>The structure shows a quercetin aglycone (a flavonol with hydroxyl groups at positions 3, 5, 7, and 3', 4') linked at the 3-position to a glucose molecule in its pyranose form. The glucose ring is shown in a chair conformation with hydroxyl groups at C2, C3, C4, and C6.</p>	<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Dracocephalum peregrinum</i>	[170] [173]
32.	Гиперозид (кверцетин-3- О-галактопиранозид)	 <p>The structure shows a quercetin aglycone linked at the 3-position to a galactose molecule in its pyranose form. The galactose ring is shown in a chair conformation with hydroxyl groups at C2, C3, C4, and C6.</p>	<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Nepeta cataria</i>	[170] [39, 114, 145]
33.	Рутин (кверцетин-3-О- рутинозид)	 <p>The structure shows a quercetin aglycone linked at the 3-position to a rutinose molecule. Rutinose is a disaccharide composed of a glucose unit and a galactose unit, both in their pyranose forms, linked together at the C1 of the glucose and C6 of the galactose.</p>	<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Nepeta cataria</i> <i>Nepeta grandiflora</i> <i>Nepeta sibthorpi</i>	[44] [39, 114] [145] [145]

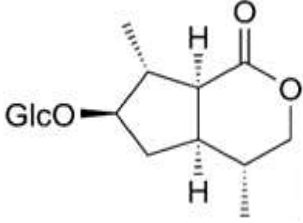
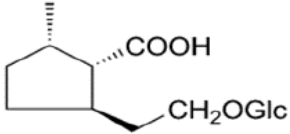
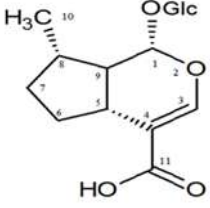
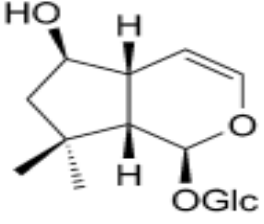
34.	Изокемпферид		<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Dracocephalum kotschyi</i>	[90] [65, 71]
35	Каликоптерин		<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Dracocephalum kotschyi</i>	[90] [65, 71]
36.	Мирицетин		<i>Nepeta cataria</i> <i>Nepeta fissa</i> <i>Nepeta leucophylla</i> <i>Nepeta nuda subs. albiflora</i>	[114] [145] [145] [145]

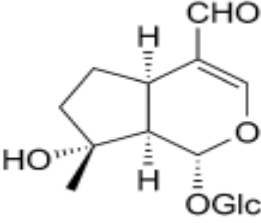
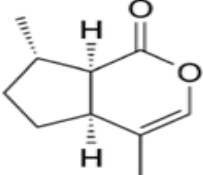
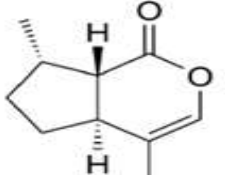
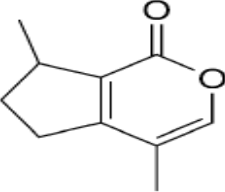
37.	Изорамнетин		<i>Dracocephalum moldavica</i>	[90, 173]
Флавононы				
38.	Нарингенин		<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Dracocephalum rupestre</i> <i>Dracocephalum palmatum</i> <i>Nepeta cataria</i> <i>Nepeta ernestimayer</i> <i>Nepeta × faassenii</i> <i>Nepeta grandiflora</i> <i>Nepeta mussinii</i>	[109] [173] [135] [145] [145] [145] [145] [145]
39.	Эриодиктиол		<i>Dracocephalum peregrinum</i> <i>Dracocephalum rupestre</i> <i>Dracocephalum palmatum</i> <i>Nepeta cataria</i>	[61] [135] [126] [67]

40.	Гесперидин		<i>Nepeta cataria</i>	[114]
Фенилпропаноиды				
41.	Розмариновая кислота		<i>Dracocephalum heterophyllum</i> <i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Dracocephalum palmatum</i> <i>Dracocephalum kotschyii</i> <i>Dracocephalum tanguticum</i> <i>Nepeta cadmea</i> <i>Nepeta cataria</i> L. <i>Nepeta cataria</i> ssp <i>citriodora</i> <i>Nepeta ernesti-mayer</i> <i>Nepeta fissa</i> <i>Nepeta grandiflora</i>	[173] [62] [146] [65,71] [19, 38, 39, 114] [
42.	Хлорогеновая кислота		<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Dracocephalum peregrinum</i> <i>Nepeta cadmea</i> <i>Nepeta cataria</i> <i>Nepeta sibthorpii</i> <i>Nepeta trachonitica</i>	[44] [61] [145] [30,38,39, 114] [145] [145]

43.	Кофейная кислота		<i>Dracocephalum forrestii</i> <i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Dracocephalum palmatum</i> <i>Dracocephalum peregrinum</i> <i>Dracocephalum ruyschiana</i> <i>Nepeta cataria</i> <i>Nepeta cataria ssp. citriodora</i> <i>Nepeta grandiflora</i> <i>Nepeta prattii</i>	[103] [44] [126] [61] [173] [19, 38, 39, 114] [145] [145] [145]
44.	Феруловая кислота		<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Dracocephalum peregrinum</i> <i>Nepeta cadmea</i> <i>Nepeta cataria</i> <i>Nepeta grandiflora</i>	[44] [61] [145] [145] [145]
45.	Цикориевая кислота		<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Dracocephalum palmatum</i> <i>Nepeta cataria</i>	[33] [126] [19]
46.	Р-Кумаровая кислота		<i>Dracocephalum moldavica</i> <i>Dracocephalum tanguticum</i> <i>Nepeta cataria ssp. citriodora</i> <i>Nepeta leucophylla</i> <i>Nepeta nepetella ssp. cordifolia</i> <i>Nepeta trachonitica</i> <i>Nepeta tuberosa ssp. reticulata</i>	[62] [146] [145] [145] [145] [145] [145]

47.	Кофеилтартроновая кислота		<i>Nepeta cataria</i>	[19, 148]
48.	Непетоидин А		<i>Nepeta cataria</i>	[137]
49.	Непетоидин В		<i>Nepeta cataria</i>	[137]

Иридоидные гликозиды				
50.	Непетазид		<i>Nepeta cataria</i>	[168]
51.	Непетариазид		<i>Nepeta cataria</i>	[118]
52.	1,5,9 – эпидезоксилогановая кислота		<i>Nepeta cataria</i> <i>Nepeta cadmea</i> <i>Nepeta caesarea</i> <i>Nepeta grandiflora</i> <i>Nepeta nuda ssp. albiflora</i> <i>Nepeta ucrainica</i>	[152, 153] [154] [145] [121] [145] [48]
53.	Аюгол		<i>Nepeta cataria</i> <i>Nepeta septemcrenata</i>	[145] [67]

54.	Велпетин		<i>Nepeta cilicia</i>	[155]
Монотерпеноидные лактоны				
55.	4 α ,7 α ,7 α -непеталактон		<i>Nepeta cataria</i> <i>Nepeta crassifolia</i> Boiss. & Buhse	[164] [59]
56.	4 α ,7 α ,7 β -непеталактон		<i>Nepeta cataria</i> <i>Nepeta mussini</i> <i>Nepeta nuda</i> <i>Nepeta persica</i> <i>Nepeta crispa</i> <i>Nepeta faassenii</i> <i>Nepeta parnassica</i>	[164] [64] [145] [145] [145] [145] 70
57.	5,9-дегидронепеталактон		<i>Nepeta cataria</i>	[143]

1.5 Биологическая активность растений рода *Dracocephalum* L., *Nepeta* L. и перспективы применения в медицине

Виды рода *Dracocephalum* издавна применяются как лекарственные растения традиционной уйгурской медицины.

Настои из надземной части *D. moldavica* применяется в традиционной медицине при ишемической болезни сердца и гипертонии. Змееголовник молдавский входит в состав чаев «Finetea naturii», «Digesti plus», «Baby ceai» и др., производимых фирмой «Doctor Farm» (Молдова). В некоторых европейских странах его выращивают в качестве заменителя Melissa лекарственной [17]. В Российской Федерации зарегистрированы биологически активная добавка к пище «Змееголовник молдавский», применяемая в качестве источника флавоноидов, дубильных веществ, содержащей эфирное масло (пакеты по 25-500 г, фильтр-пакеты по 1,5-2,0 г, брикеты по 2,0-5,0 г, гранулы по 25-500 г) и трава змееголовника молдавского («Змееголовник молдавский-С») для применения в качестве биологически активной добавки к пище [35].

Настой из надземной части *D. heterophyllum* — это традиционное лекарство от астмы и гастропатии в Синьцзяне и Тибете. В Тибете местные жители используют травяной чай из *D. tanguticum* для лечения хронического бронхита, гепатита и гастрита [164]. Из *D. tanguticum* (сырье заготовлено в провинции Цинхай, КНР) были выделены гликозиды спермидина дракотанозиды А-Д [165].

Водное извлечение из надземной части *D. moldavica* дозозависимо уменьшало количество переходов в тесте «избегание». Эффект может считаться анксиолитическим; однако те же самые дозы также вызывали значительное сокращение общей активности мышечной в тесте «открытое поле» по сравнению с контрольной группой. Это влияние на поведение является следствием уменьшения активности животных из-за седативного действия лекарственных препаратов. Полученные результаты аналогичны тем, которые наблюдаются при высокой дозе диазепама; в них диазепам также вызывал снижение количества

переходов между светлым и темным отсеками в тесте «избегание» и общей активности в тесте «открытое поле». Водное извлечение из травы *D. moldavica* обладает седативной и миорелаксирующей активностью, снижает у подопытных животных локомоторную активность и приводит к общему ингибированию активности нейронов в центральной нервной системе (ЦНС). Седативному эффекту, вероятнее всего, способствуют присутствующие в извлечении гликозиды флавонов [109].

Этанольный экстракт из надземной части змееголовника молдавского в тестах «Принудительное плавание» и «Подвешивание за хвост» назначенный перорально в дозе 80 и 100 мг / кг показал антидепрессантный подобный эффект. Экстракт значительно уменьшал время неподвижности в тестах «принудительное плавание» и «подвешивание за хвост». Авторы считают, что этот эффект связан с флавоноидными соединениями [180].

В исследовании Jiangtao Jiang и др. оценивались антиоксидантные и кардиопротекторные эффекты суммы флавоноидов, выделенных из надземной части *Dracosephalum moldavica* L против острой ишемии, изолированного сердца крысы. Сумма флавоноидов проявляла сильную антирадикальную активность, которая заключалась в реакции гибели 1,1-дифенил-2-пикрилгидразильных, гидроксильных и супероксидных анион-радикалов в *in vitro*. Сумма флавоноидов (5 мкг/мл) в методе изолированное сердце по Лангендорфу по сравнению с группой контроля снижала частоту сердечных сокращений и коронарный проток, повышало давление левого желудочка и уменьшались уровни ферментов креатинкиназы, лактатдегидрогеназы в коронарном протоке. Размер инфаркта был меньше по сравнению с группой контроля. Активность супероксиддисмутазы и отношение глутатиона дисульфида / глутатиона увеличивались, и вследствие этого содержание малонового диальдегида снижалось в группах, получавших сумму флавоноидов. Сумма флавоноидов обладает защитным действием от повреждения I / R миокарда, что может быть связано с антиоксидантными свойствами экстракта. [87].

Суммарный экстракт из надземной части *D. moldavica* вызвал значительное сокращение числа желудочковой тахикардии (VT), общих желудочковых эктопических сокращений (VEB) и VT продолжительности в периоды ишемии и реперфузии. Частота ишемического VT снижена с 93% в контрольной группе до 0, 50 и 50% в группах, получавших экстракт. Размер инфаркта составлял $37 \pm 1\%$ в контрольной группе, однако перфузия экстракта (25, 50, 200 мкг / мл) уменьшали его до 13 ± 2 , 8 ± 1 и $18 \pm 2\%$ соответственно ($P < 0,001$). Кроме того, экстракт заметно понижал объем инфарктной ткани по сравнению с контрольной группой ($P < 0,05$) [122].

Обнаружено, что водный экстракт из надземной части *D. moldavica* обладает антиишемическим действием в экспериментах на животных. Экстракт значительно продлевает время выживания при гипоксии, действует против индуцированного изопротеренолом увеличения потребления кислорода миокардом, улучшает толерантность к гипоксии, действует против индуцированного вазопрессином миокардиальной ишемии с острыми изменениями ST-T, снижает частоту сердечных сокращений и продлевает интервал PR.

В исследовании Dilinuer Maimaitiyiming и др. проводилось испытание на крысах с целью эффективности лечения хронической горной болезнью экстрактом из надземной части *D. moldavica*. Результаты показали, что в группе моделей с хронической горной болезнью уровни интерлейкина-6 (IL-6), С-реактивного белка (CRP) и малонового диальдегида (MDA) оказались значительно выше, чем в группе, получавшем экстракт. Экстракт *D. moldavica* может снизить уровни интерлейкина-6 (IL-6), С-реактивного белка (CRP), уменьшить давление в легочной артерии и способствовать восстановлению состояния сердца [106].

Биологически активные вещества имеют широкий спектр применения при лечении сердечно-сосудистых заболеваний. В исследовании Mei-e Tan и др. разработали твердые липидные наночастицы с суммарным флавоноидным экстрактом из *Dracocephalum moldavica* L., и оценили терапевтический эффект на

модели ишемического реперфузионного повреждения миокарда крыс. Результаты показали, что суммарный экстракт флавоноидов из змееголовника молдавского и твердые наночастицы с включенным суммарным флавоноидным экстрактом из змееголовника молдавского обеспечивали защиту миокарда, а защитный эффект наночастиц с суммарным флавоноидным экстрактом был значительно выше, чем у исходного экстракта, в зависимости от размера инфаркта, гистопатологического изучения, уровней кардиоспецифических ферментов (лактатдегидрогеназы и креатинкиназы) и цитокинов (интерлейкин- β , фактор некроза опухоли- α) [157].

Экстракт *D. moldavica* показал антиоксидантную активность. Оцениваемые антиоксидантные свойства включали восстановление железа (III), хелатирование железа (II), и улавливание свободных радикалов: 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил, 2,2'-азинобис (3-этилбензотиазолин-6-сульфонат) и супероксид-анион. Кроме того была оценена способность экстракта защищать 2-дезоксид-*D*-рибозу и фосфолипид бычьего мозга от разложения, опосредованного гидроксильными радикалами. Экстракт травы змееголовника молдавского продемонстрировал активность во всех антиоксидантных тестах; однако он не был таким сильным, как положительный контроль, за исключением анализа на основе фосфолипидов, где его активность по улавливанию гидроксильных радикалов была статистически неотличима от активности, продемонстрированной пикногенолом.

Наї и др. сообщили, что водный экстракт *D. tanguticum* могут значительно снизить потребление кислорода мышами при внутрибрюшинной инъекции 2,5 г / кг и 5,0 г / кг ($P < 0,01$). Устойчивость тканей к гипоксии, индуцированной KCN и NaNO_2 , была повышена, и, следовательно, время выживания мышей значительно увеличилось. Кроме того, водный экстракт *D. tanguticum* могут значительно увеличить продолжительность дыхания, вызванного обезглавливанием, у мышей и время выживания мышей после двустороннего лигирования сонной артерии ($P > 0,01$). Все растение *D. heterophyllum*, которое скармливалось непосредственно кроликам, показало значительную антигипоксическую активность в нескольких экспериментальных моделях, измеряющих данные плотности RBC, Hb, Hct, мегакариоцитов и синусоид костного мозга (BMS), изменения в

митохондриальных и мягких эндоплазматических ретикулулах в скелете Лейдига, содержание амина, изменение ультраструктуры в коре головного мозга и области СА3 гиппокампа. Kim и др. исследовали противоаллергическое действие водного экстракта *D. argunense* (DAAE). Они обнаружили, что DAAE ингибировал системные реакции, инициируемой соединением 48/80, и высвобождение гистамина из сыворотки у мышей, ослаблял IgE-опосредованную кожную аллергическую реакцию. Уровень цАМФ временно повышался при лечении DAAE. Экстракт также может блокировать активацию митогенактивированной протеинкиназы p38 (МАРК), индуцированной форболом 12-мирилат-13-ацетатом (РМА) плюс кальций-ионофор А23187, снижать секрецию провоспалительных цитокинов, таких как фактор некроза опухоли- α и интерлейкин-6, в тучных клетках. Эти результаты показали, что DDAE ингибировали аллергические реакции, происходящие из тучных клеток, и показали участие цАМФ для высвобождения гистамина и p38 МАРК для секреции провоспалительных цитокинов [173].

Talari M. и др. определили, что экстракт *D. kotschy* (250 мкг/мл) индуцировал образование активных форм кислорода (АФК), проницаемость митохондриальной мембраны (ММР), набухание митохондрий и выброс цитохрома С только в опухолевых гепатоцитах. Эти данные указывают на то, что экстракт из *Dracocephalum kotschy* является перспективным источником изучения в качестве потенциального противоопухолевого средства [156]

Каликоптерин основное активное соединение *D. kotschy*, ингибировал пролиферацию лимфоцитов дозозависимо со значением IC₅₀ 1,7 мг / мл. Значение IC₅₀ дексаметазона в качестве положительного контроля составляло 0,3 мг / мл [173]. Также в другом исследовании каликоптерин уменьшал ДНК в «хвосте». H₂O₂ снижает потенциал на внутренней мембране митохондрий (ММР), в то время как каликоптерин предотвращал это снижение ММР в присутствии H₂O₂. В клетках, обработанных H₂O₂, каликоптерин также подавляет высвобождение цитохрома С в цитозоль, что необходимо для поддержания митохондриального гомеостаза в выживших клетках. Кроме того, каликоптерин в присутствии H₂O₂

ингибировал снижение, вызванное окислительным стрессом, у чувствительных к стрессу транскрипционных факторов, CREB и Nrf2, которые играют важную роль в антиоксидантной способности клетки. Также наблюдалось увеличение уровней γ -GCS и HO-1 в клетках, предварительно обработанных каликоптерином. В присутствии H_2O_2 каликоптерин ингибировал снижение уровня GSH и активности SOD.

Природный флавоноид каликоптерин обладает нейропротекторным действием на окислительный стресс, индуцированный H_2O_2 , в дифференцированных клетках PC12 путем модулирования уровня фосфорилирования CREB и пути Nrf2 [142]

Jahaniani и др. сообщили, что метанольный экстракт листьев *D. kotschyii* ингибировал пролиферацию опухолей у мышей. Кроме того, они сообщили, что активный компонент в экстракте листьев *D. kotschyii*, ксантомикрол, ингибировал пролиферацию ряда злокачественных клеток, включая HL60, K562, Saos-2, A2780-ср, A2780-s и HFFF -P16. Ксантомикрол был более селективным по отношению к злокачественным клеткам, чем доксорубицин [81].

Настой из надземной части *D. rupestre* Hance известен в Китайской традиционной медицине как растительное лекарственное средство противовоспалительного действия и в основном применяется при головной боли, заболеваниях печени.

Нарингенин-7-О-глюкозид, выделенный из *D. rupestre* при концентрации 10, 20 и 40 μ m значительно снижал потерю жизнеспособных кардиомиоцитов на доксорубициновой модели кардиомиопатии. Нарингенин-7-О-глюкозид также увеличивал уровни белка гем-оксигеназы-1 (HO-1) и Bcl-2 в кардиомиоцитах и подавлял экспрессию мРНК каспазы-3 и каспазы-9. Эти результаты свидетельствуют о том, что нарингенин-7-О-глюкозид оказывает защитное действие против апоптоза, вызванного доксорубицином, что предполагает возможное использование нарингенина-7-О-глюкозида в качестве терапевтического средства для лечения или профилактики кардиомиопатии. В другом исследовании Nan и др. сообщили, что нарингенин-7-О-глюкозид может предотвратить кардиотоксичность доксорубицина путем индукции эндогенных

антиоксидантных системы защиты посредством фосфорилирования ERK1 / 2 и ядерной транслокации Nrf2, обладающей эффектом, сравнимым с эффектом кверцетина [173].

Этилацетатная фракция (ЭАФ) из надземной части *D. rupestre* заметно снижала уровни MDA и LDH в печени. Обнаружено, что этилацетатная фракция из надземной части *D. rupestre* проявляла сильную антиоксидантную активность, а также уменьшала вызванное CCl₄ острое повреждение печени у мышей. Авторы связывают эту активность с фенольными соединениями, в частности, с розмариновой кислотой, которая обладает гепатозащитными и антиоксидантными свойствами [179].

Исследование биологической активности *D. palmatum* в условиях *in vitro* показало, что его экстракты обладают сильным антиоксидантным действием благодаря присутствию высоких концентраций фенольных соединений [126].

Экстракт (300 мг / кг) из побегов *D. polychaetum* значительно снижал уровень глюкозы в сыворотке (27,1%) через 120 минут в глюкозотолерантном тесте (OGTT). Уровни сывороточного креатинина, триглицеридов, холестерина, аланинаминотрансферазы и MDA в плазме, эритроцитах и поджелудочной железе значительно снизились у диабетических крыс получавших экстракт, в это же время содержание GSH в поджелудочной железе, супероксиддисмутазы и каталазной ферментативной активности возросло ($p < 0,05$). Значения IC₅₀ для экстракта и бутилгидроксианизола составляли 5,6 и 1,15 мг / мл в DPPH и 0,155 и 0,062 мг / мл в спектрофотометрическом определении антиоксидантов методом FRAP соответственно. Экстракт не оказывал ингибирующего действия на активность α -амилазы. Содержание суммы флавоноидов в экстракте в пересчете на кверцетин 1,8% (г/г) [131].

Бутанольная фракция, полученная *Dracocephalum tanguticum* Maxim способствовало восстановлению нейрорповеденческого состояния после церебральной ишемии. Бутанольная фракция из травы *Dracocephalum tanguticum* Maxim обладает потенциалом для лечения ишемического повреждения мозга

путем стимуляции антиоксидантной активности и синтеза нейротрофических факторов [169].

В работе M. Rabbanі с соавторами [132] исследовали влияние водно-спиртового извлечения из надземной части *N. persica* на поведение лабораторных животных в тесте «приподнятый крестообразный лабиринт». При внутривнутрибрюшинном введении самцам мышей линии NMRI исследуемое извлечение в дозе 50 мг/кг значительно увеличивало число входов и время нахождения в открытом рукаве. Эта доза не влияла на локомоторную активность животного и на продолжительность сна, вызванного кетаминном. В дозе 100 мг/кг извлечение увеличивало локомоторную активность. Таким образом, установлено, что извлечение из травы *N. persica* в дозе 50 мг/кг обладает анксиолитическим действием с менее выраженными седативным и гипнотическим эффектами, чем у диазепама, и вызывает неспецифическую стимуляцию при 100 мг/кг. Водно-спиртовые извлечения из травы *N. cataria* показали двухфазные эффекты на поведение цыплят: низкие и умеренные уровни дозы (25–1800 мг/кг) приводили к увеличению числа засыпающих цыплят, в то время как высокие уровни дозы вызывали уменьшение их количества [147]. Экстракты *N. cataria* проявляют ингибирующее действие на показатели окислительного стресса [120].

Объектом исследований Formisano С. с соавторами [67] была *N. sibthorpii* Benth. (к. Сибторпа) – син. *N. argolica* Boryet Chaub. – многолетнее травянистое растение, распространенное в Греции, на юге Албании и в юго-восточной части бывшей Югославии (ныне Северная Македония). В опытах на грызунах на наличие нейрофармакологической активности изучались полученные из травы *N. sibthorpii* метанольное извлечение (после удаления экстрагента), эфирное масло и его фракция, содержащая эпинепетолактон. Все препараты вносили изменения в общую картину поведения и потенцировали сон, вызванный пентобарбиталом натрия. Угнетение ЦНС наиболее вероятно связано с ГАМК-опосредованным влиянием эпинепетолактона. В работе Hosseini А. с соавторами [76] приводятся данные исследования извлечений из травы *N. glomerulosa* Boiss. (к. клубочкового) – суммарного извлечения и его фракций – водной, этилацетатной и бутанольной.

Исследования проводились на мышах, было установлено, что все исследуемые извлечения в дозе 50–200 мг/кг увеличивали продолжительность сна, индуцированного диазепамом. Клинические исследования. Лиофилизированное водное извлечение *N. menthoides* Boiss. ex Buhse (котовника мятовидного) использовали в лечении депрессии. Двадцать два пациента из двух психиатрических клиник Ширазского медицинского университета (Республика Иран) участвовали в двойном слепом рандомизированном контролируемом исследовании в период с апреля по сентябрь 2015 г. На основе структурированного клинического опроса, как определено в «Диагностическом и статистическом руководстве по психическим расстройствам» (5-е изд.), пациенты соответствовали основным критериям депрессии. Пациенты были сгруппированы случайным образом для приема извлечения из травы *N. menthoides* или сертралина в течение 4 недель. По сравнению с контрольной группой, у группы, принимавшей извлечение из травы *N. menthoides*, средние значения опросника Бека на выявление депрессии были значительно выше. В этой группе, которая обследовалась в течение 2 недель после вмешательства, была выявлена и более низкая частота рецидивов. Извлечение, как фитопрепарат, может успешно применяться для нормализации настроения у пациентов с выраженной депрессией, так как установлено, что оно обладает антидепрессивным эффектом и препятствует рецидиву депрессии [95]

Выводы к главе 1

В результате анализа литературных данных было определено:

1. Экстракты из травы змееголовника молдавского обладают нейротропной, кардиопротерной и антиоксидантной активностями.
2. Химический состав экстрактов из травы растений сем. *Lamiaceae* таких как змееголовник молдавский, котовник кошачий и котовник крупноцветковый, обладающих нейротропной активностью, представлен фенольными соединениями (фенилпропаноиды и флавоноиды), а также иридоидами.
3. Трава змееголовника молдавского, котовника кошачьего и котовника крупноцветкового являются источником сырья для получения лекарственных средств, обладающих нейротропным действием.
4. Сырье змееголовника молдавского и сырье котовника кошачьего культивируется в различных климатических зонах Российской Федерации.

ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ, МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.1 Объекты исследования

Осуществляли сбор высушенной травы змееголовника молдавского, заготовленной на территории Самарской области Средне-Волжского филиала ФГБНУ ВИЛАРА и Краснодарского края Северо-Кавказского филиала ФГБНУ ВИЛАР в 2016–2019 годах, на полях селекционного севооборота ФГБНУ ВИЛАР в 2016-2019 годах. Котовника кошачьего трава, заготовленная в Ботаническом саду ВИЛАР, фармакопейный участок, в Белгородской области и Северо-Кавказском регионе в 2018-2019 г; надземная часть котовника крупноцветкового в Курахском районе в окрестности села Ашар в 2017 году.

Морфологическое и анатомическое исследование сырья осуществляли с использованием Государственной фармакопеи Российской Федерации XIV издания методик описанных в ОФС.1.5.1.0002.15 «Травы» и ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Микропрепараты изучали с помощью биологического микроскопа «Альтами БИО 2 LED» с цифровой окулярной USB-камерой 3,1 Мпикс (Россия). Фотографии были обработаны на компьютере в программе Adobe Photoshop 7.0.

Сбор сырья проводили в различные фазы вегетации с целью дальнейшего изучения накопления действующих веществ. Сушку проводили воздушно-теневым способом путем равномерного распределения сырья тонким слоем с периодическим перемешиванием.

2.2 Методы исследований

2.2.1 Химические и физико-химические

Качественные реакции

Для определения фенольных соединений в сырье были проведены качественные реакции: проба Шинода и с 3%-ным раствором железа хлорида.

Получение извлечения для обнаружения флавоноидов в сырье:

аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм. В колбу вместимостью 100 мл помещают 2 г измельченного сырья, прибавляют 40 мл спирта этилового 50% и нагревают на кипящей водяной бане в течение 15 мин. После охлаждения до комнатной температуры полученное извлечение фильтруют через складчатый фильтр «синяя лента» в коническую колбу вместимостью 100 мл. Фильтрат использовали для проведения цианидиновой пробы (пробы Шинода): к 3 мл извлечения добавляли 4 капли кислоты хлористоводородной, 10 мг металлического цинка и полученную реакцию смесь нагревали в течение 5 минут на водяной бане. Образуется розово-красное окрашивание.

К 1 мл фильтрата добавляют 2 мл 5% раствора алюминия (III) хлорида в этиловом спирте 96%. Появляется окрашивание раствора в желтый цвет.

Тонкослойная хроматография (ТСХ)

ТСХ использовали для обнаружения фенилпропаноидов. Для хроматографического анализа в качестве неподвижной фазы применяли пластинки Sorbfil ПТСХ-ПА размером 10×15 см. Хроматографирование осуществляли восходящим способом в системе растворителей этилацетат–уксусная кислота – вода (40:5:5). В экспериментах использован стандартный образец (СО) розмариновой кислоты («Sigma Aldrich», кат. №536954-5G), СО кофейной кислоты («Sigma Aldrich», кат. № Sigma Aldrich, кат. 331-39-5)

Хроматограммы детектировали 10%-ным раствором хлорида алюминия в спирте этиловом 96%-ном и прогревали в течение 2–3 мин при температуре 105 °С. Пластинку просматривают в УФ-свете при длине волны 366 нм.

Высокоэффективная жидкостная хроматография

Изучение качественного состава фенольных соединений в бутанольной фракции сухого экстракта котовника кошачьего и к. крупноцветкового проводили на высокоэффективном жидкостном хроматографе. Количественное определение розмариновой кислоты было выполнено методом ВЭЖХ (высокоэффективная жидкостная хроматография) с диодно-матричным детектором на хроматографе фирмы Shimadzu модель Prominence-I LC-2030C 3D. Разделение проводилось на колонке Luna 5µm c18 длиной 250 мм и диаметром 46 мм, которая термостатировалась при 20 °С. Элюирование осуществлялось при скорости потока 0,9 мл/мин в градиентном режиме смесью 1 % раствора трифторуксусной кислоты в воде и ацетонитрилом в течение 35 мин. Содержание ацетонитрила в элюенте: 0 мин – 18 %, 27 мин - 55 %, 28 мин – 18 %. В качестве стандартного образца использовалась субстанция фирмы Sigma-aldrich с чистотой 97%. Калибровка проводилась методом внешнего стандарта по 5 точкам от 8 мкг/мл до 161 мкг/мл.

Для разработки методики количественного определения розмариновой кислоты в сухих экстрактах котовника кошачьего и котовника крупноцветкового были следующие условия хроматографирования:

Прибор

Хроматограф жидкостный с программным управлением и компьютерной обработкой результатов анализа, например, марки Shimadzu Prominence LC-20AD с дегазатором DGU-20A3R или аналогичный;

Колонка	250 × 4,6 мм, C ₁₈ (размер частиц сорбента 5 мкм) категория L1 по USP, например Zorbax Eclipse XDB-C18 или аналогичная при условии соблюдения требований пригодности хроматографической системы;
Детектор	спектрофотометрический;
Длина волны детектирования	330 нм;
Режим элюирования	изократический
Температура колонки	35°C;
Температура ячейки	35°C;
Скорость потока	1 мл/мин;
Объем вводимой пробы	20 мкл;
Способ введения	инжектор с дозирующей петлей

ВЭЖХ-УФ-МС анализ состава сухого очищенного экстракта «Розматин» проводили с помощью системы ВЭЖХ Agilent 1290 (Agilent Technologies, Германия), оснащенной насосом, дегазатором и термостатируемым автосэмплером. В качестве детекторов использовали диодную матрицу и tandemный квадрупольный масс-спектрометр Agilent 6430 (QQQ). Объем вводимой в инжектор пробы 10 мкл. Условия ВЭЖХ-разделения: хроматографическая колонка Brownlee SPP C18 2.1 мм×150 мм, 2,7 мкм, подвижная фаза – 0,1% водный раствор муравьиной кислоты (А) и ацетонитрил (В). Скорость подачи элюента – 0,25 мл/мин, градиентный режим: 95% А - 5% В, 5 мин. - 95% А - 5% В, 30 мин. - 70% А - 30% В, 40 мин. - 30% А - 70% В, 45 мин. - 10% А - 90% В, 47 мин. - 95% А - 5% В, 50 мин. - 95% А - 5% В; общее время анализа – 50 мин. УФ-детектирование проводили на следующих длинах волн, характеристичных для биологически активных веществ-полифенолов: $\lambda=290,0$ нм и $\lambda=340,0$ нм. Регистрацию масс-спектров осуществляли в режиме ионизации электрораспылением (регистрация положительных и отрицательных ионов), поток газа-осушителя – 10 л/мин, температура газа-осушителя – 320 °С, напряжение на фрагменторе – 135 В, на капилляре – 4000 В. Управление сбором и обработкой масс-спектральных данных на всех этапах работы осуществлялось с помощью стандартного программного обеспечения масс-спектрометров фирмы

Agilent Technologies («Mass Hunter»). Данная система позволяет полностью автоматизировать настройку масс-детектора, задание и контроль режимных параметров, регистрацию выходных сигналов, обработку экспериментальных данных, включая идентификацию веществ и выдачу результатов анализа.

Навеску образца массой 10,0 мг помещали в пробирку типа «Эппендорф», добавляли 1,0 мл смеси метанол:вода (60:40) и проводили экстракцию на УЗ-бане в течение 30 минут. Отмечали полное растворение навески образца в экстрагенте и переносили его в хроматографическую виалу для проведения анализа.

ЯМР-спектроскопия

Идентификацию полученных веществ проводили также методами ^1H - и ^{13}C -ЯМР. Спектры ЯМР были получены на спектрометре GEMINI-200 (Varian, США); Время одного накопления (AT) – 1 с. Число накоплений (NT) – 1000 (^1H) и 20000 (^{13}C). Для количественных измерений применялась релаксационная задержка (D1) – 2 с. Для сужения сигналов 5-ОН протонов применяли Лоренц - Гауссово преобразование. Химические сдвиги измеряли относительно сигнала растворителя ДМСО- D_6 (δ , м.д.: ^1H 2,50; ^{13}C 39,5).

Газожидкостная хроматография

Состав эфирного масла котовника кошачьего, полученного из разных климатических зон произрастания, определяли методом газожидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГЖХ-МС) на хромато-масс-спектрометре Varian 450GC-220MS с масс-анализатором типа «ионная ловушка».

Хроматографическое разделение компонентов пробы проводили на кварцевой капиллярной колонке FactorFOUR VF-5ms (30м×0,25 мм). Газ носитель - гелий с постоянной скоростью потока 1,0 мл/мин. В инжектор хроматографа при температуре 200°C (деление потока 10) вводят по 1 мкл пробы. Температурная

программа колонки: 50°C – 5 мин, нагрев до 110°C со скоростью 5°C/мин, 110° - 2 мин, нагрев до 240°C – 25°C/мин, изотерма при 240 °C 10 мин. (34, 2 мин).

Идентификацию разделенных компонентов проводили с использованием библиотеки масс-спектров NIST Version 2f и алгоритмов сравнения программного обеспечения Saturn (Varian). Количественную оценку осуществляли методом нормализации по площади пиков (полный ионный ток) идентифицированных соединений с использованием автоматической системы обработки.

УФ-Спектрофотометрия

Количественное определение суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту в траве змееголовника молдавского проводили методом прямой спектрофотометрии.

Приготовление раствора розмариновой кислоты. Около 0,01 г (точная навеска) СО розмариновой кислоты, предварительно выдержанной в эксикаторе не менее 48 часов, помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и растворяют в 50 мл спирта этилового 50%, после чего объем раствора доводят тем же растворителем до метки, перемешивают. В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 2 мл полученного раствора и доводят его объем до метки спиртом этиловым 50%, перемешивают.

Способ получения 1,5,9 -эпидезоксилогановой кислоты из травы котовника кошачьего

Для выделения 1,5,9-эпидезоксилогановой кислоты из травы котовника кошачьего провели фракционирование полученного экстракта.

100 г измельченного сырья травы котовника кошачьего экстрагировали 70 % спиртом этиловым, в соотношении сырье : экстрагент (1:10), при комнатной температуре, при подаче на каждую последующую экстракцию свежий экстрагент, равный слитому извлечению, полученные экстракты упаривают последовательно по мере поступления до объема до 1/20, водные кубовые

концентраты объединяют и обрабатывают три раза хлороформом в соотношении хлороформ : водная фаза равном 1:2, органическую фазу отделяют, а водный кубовый остаток сушат.

Из сухого очищенного водно-спиртового экстракта путем растворения его в воде с последующей его деминерализацией, а затем обработкой н-бутиловым спиртом, была получена бутанольная фракция, которую промыли дистиллированной водой и высушили.

Бутанольное извлечение, промытое водой, делили на колонке с целлюлозой Filtrak в соотношении 1:30.

0,5 г вещества нанесли на колонку с целлюлозой в воде, элюацию проводили водой в одну колбу (300 мл). Водный элюат упарили. После хроматографической колонки с целлюлозой мы провели вторую колонку с полиамидом (Woelm). Колонку промывали элюентом для ВЭЖХ. Фракции собирали по 20 мл. Фракции с 4-8 объединили и упарили. В этой фракции содержится одно вещество – иридоидный гликозид 1,5,9 эпидезоксилогановая кислота (Т. пл. 106 °С (разл.)), М. м. 360,36, C₁₆H₂₄O₉)

Способ выделения тилианина и лютеолин-7-глюкуронида из «Розматина»

Деление «Розматина» осуществляют методом колоночной хроматографии. Хроматографический контроль проводят с использованием пластин для ТСХ «Сорбфил» в системе растворителей этилацетат - уксусная кислота - вода (40 : 5 : 5). Детектирование проводят путем опрыскивания пластин 10 % спиртовым раствором алюминия хлорида и высушивают в сушильном шкафу при температуре 100 °С в течение 1-2 мин, затем пластинку просматривают в Уф-свете при длине волны 366 нм. «Розматин» в количестве 1,26 г наносят на колонку с полиамидом марки «Woelm» в соотношении (1:30). Экстракт сначала растворяют в 5 мл спирта этилового и смешивают с 10 г полиамида с последующим высушиванием. После чего эту смесь наносят на колонку с полиамидом. Колонку элюируют последовательно смесью этилацетат:гексан

(9:10) 2 л; этилацетат 1 л; смесью спирт этиловый +5 % хлороформа (300 мл); спирт этиловый + 15 % хлороформа 600 мл; 92 % спирт этиловый 900 мл; 70 % водным спиртом этиловым 500 мл.

Среди фракций, полученных элюацией 92 % и 70 % водным спиртом отбирают те, которые по данным ТСХ содержат одну зону адсорбции, ярко-желтой флюоресценции в УФ-свете, $R_f=0,53$. Объединенную фракцию весом 0,0362 г кристаллизуют из спирта, получают 0,025 г лютеолин-7-О- β -D-глюкуронида (т. пл. 242-244°C, М.м. 462,36 г/моль, $C_{21}H_{18}O_{12}$). Идентификацию полученных веществ проводят 1H- и 13C- ЯМР методами исследования и методом ВЭЖХ-МС-УФ

Розматин в количестве 1,26 г наносят на колонку с силикагелем L40/100 в соотношении 1:20. Экстракт растворяют в 5 мл спирта этилового и смешивают с 10 г силикагеля с последующим высушиванием. Полученную смесь наносят на уплотненный слой силикагеля в хлороформе (диаметр хроматографической колонки 2,5 см). Колонку хроматографируют последовательно смесью хлороформ:этанол : 95:5; 90:10; 80:20. Фракции, содержащие доминирующее вещество объединяют, концентрируют, выпавший осадок отделяют, а затем кристаллизуют из спирта. Получают 0,06 г тилианина ($C_{22}H_{22}O_{10}$, М.м. 446,4 г/моль; т.пл. 336-338 °C).

Идентификацию полученного вещества проводят 1H- и 13C- ЯМР методами исследования.

2.2.2 Химико-технологические методы

Экстракты котовника кошачьего и котовника крупноцветкового были получены экстрагированием 70 % спиртом этиловым в соотношении сырье: экстрагент (1:10) при комнатной температуре (15 - 25 °C) при постоянном перемешивании (Верхнеприводная механическая мешалка ИКА RW 200) в течение 2 часов. Экстракцию повторяли дважды, подавая каждый раз в экстрактор спирт этиловый 70 % в количестве, равном объему слитого извлечения. Полученные

извлечения фильтровали и объединяли и упарили до водного кубового остатка. Водный кубовый остаток обработали 3 раза хлороформом в соотношении хлороформ - водный кубовый остаток (1:2). Водный кубовый остаток был очищен от хлорофилла, терпеноидов и липидов. Водный кубовый остаток после обработки хлороформом высушен досуха на роторном испарителе.

Этилацетатные фракции получали следующим способом: 20 г (точная навеска) измельченного сырья котовника кошачьего экстрагировали 200 мл 70 % спиртом этиловым в течение 2 часов при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Экстракцию повторяли 2 раза, подавая каждый раз в экстрактор спирт этиловый (70±5) % в количестве, равном объему слитого извлечения. Отфильтровали. Упарили до водного кубового остатка, обработали 3 раза хлороформом. К водному остатку добавили катионит (H⁺) до кислой реакции, Затем отфильтровали через фильтр Шотта ПОР 100. Фильтрат обработали этилацетатом дважды и этилацетатные извлечения упарили досуха. Получили этилацетатную фракцию из водного кубового остатка. Таким же способом была получена этилацетатная фракция из травы котовника крупноцветкового.

Бутанольные фракции получали следующим образом: 20 г (точная навеска) измельченного сырья котовника кошачьего экстрагировали 70 % спиртом этиловым в соотношении сырье-экстрагент (1:10) в течение 2 часов при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Экстракцию повторяли 2 раза, подавая каждый раз в экстрактор спирт этиловый 70 % в количестве, равном объему слитого извлечения. Отфильтровали. Упарили до водного кубового остатка, обработали 3 раза хлороформом. К водному кубовому остатку добавили катионит (H⁺) до кислой реакции. Затем обработали н-бутанолом дважды, водную часть отделили, а бутанольную – промыли дважды дистиллированной водой, а затем промытый водой бутанольный экстракт отгоняют в виде азеотропы с водой, с получением экстракта. Таким же способом была получена бутанольная фракция из травы котовника крупноцветкового.

Экстракт сухой «Розматин» получен экстракции измельченного сырья этиловым спиртом, фильтрации, упаривании, при котором измельченную

надземную часть змееголовника молдавского, заготовленного в фазу цветения, трижды экстрагируют - 50-ти % спиртом этиловым, при соотношении сырье-экстрагент (1:10), при комнатной температуре и постоянном перемешивании, при подаче на каждую последующую экстракцию свежий экстрагент, равный слитому извлечению, полученные экстракты упаривают последовательно по мере поступления до объема до 1/20. Водные кубовые концентраты объединяют и обрабатывают три раза хлороформом в соотношении хлороформ : водная фаза равном 1:2, органическую фазу отделяют, а водный кубовый остаток переосаждают спиртом этиловым 96% в соотношении 1:10, выпавший осадок отстаивают, упаренный надосадочный раствор из предыдущей стадии растворяют при 65°C в дистиллированной воде, затем добавляют катионит до pH равного 3, фильтруют, полученный раствор экстрагируют н-бутанолом трижды в соотношении 1:2, водный слой отделяют, бутанольный экстракт промывают водой дистиллированной дважды, а затем промытый водой бутанольный экстракт отгоняют в виде азеотропы с водой, с получением экстракта.

Для получения эфирного масла из травы котовника кошачьего была проведена экстракция травы гексаном в соотношении сырье - экстрагент (1:10) при комнатной температуре в течение суток. Полученное гексановое извлечение отфильтровали и передали на ГЖХ с целью определения химического состава эфирного масла.

2.2.3 Биологические методы

Исследования проводили в отделе клинической и экспериментальной фармакологии в ФГБНУ ВИЛАР. Проведены исследования по определению острой токсичности «Розматина», определению его нейротропной активности и влиянию на сердечно-сосудистую систему, противовоспалительной активности, влиянию на состояние слизистой оболочки желудка крыс с использованием этаноловой модели.

Проведено определение параметров острой токсичности «Розматина». При изучении острой токсичности экстракта по методу Кербера (Приложение 7).

Для изучения нейротропной активности, влияния на показатели деятельности сердечно-сосудистой системы (частоту сердечных сокращений, систолическое и диастолическое артериальное давление) (Приложение 8, Таблица 2), а также нервной системы (в тестах по изучению спонтанной двигательной активности и влиянию (Приложение 8, Таблица 2)), а также на параметры хлоралгидратного сна (Приложение 8, Таблица 3)) мышей. Проведены эксперименты по изучению влияния курсового введения «Розматина» в дозах 10 и 100 мг/кг. В качестве препарата сравнения использовали валерианы экстракт (таблетки, содержащие 20 мг густого экстракта валерианы) в дозе 100 мг/кг. Исследование проводили по стандартной методике, используя актометр фирмы Ugo Basile (Италия) с автоматической регистрацией. У животных измеряли частоту сердечных сокращений, систолическое и диастолическое артериальное давление с использованием аппаратно-программных комплексов «Систола» и «Флогистон» (производитель ООО «Нейроботикс», г. Москва) (Приложение 8).

Проводили изучения влияния экстракта «Розматин» на параметры сна, вызванного «корковым снотворным анализатором» хлоралгидратом. В качестве препарата сравнения использовали валерианы экстракт (таблетки, содержащие 20 мг густого экстракта валерианы) в дозе 100 мг/кг (Приложение 8).

Для изучения влияния на нервную деятельность животных однократного введения экстракта «Розматин» проводили на модели «хлоралгидратный сон», препарат сравнения - экстракт пустырника в дозе 100 мг/кг (таблетки, содержащие 14 мг густого экстракта) (Приложение 11).

Для изучения нейротропной активности «Розматина» проводили на модели «открытое поле» при 4 дневном введении. Препарат сравнения таблетки экстракта пустырника в дозе 100 мг/кг (таблетки, содержащие 14 мг густого экстракта) (Приложение 10).

Для изучения влияния на центральную нервную систему и поведение животных однократного введения экстракта «Розматина» проводили на моделях

«приподнятый крестообразный лабиринт». Препарат сравнения таблетки экстракта пустырника в дозе 100 мг/кг (таблетки, содержащие 14 мг густого экстракта) (Приложение 9)

Проводилось изучение влияния на состояние слизистой оболочки желудка крыс в условиях острых экспериментальных язв с использованием этаноловой модели экстракта «Розматин». Препарат сравнения омепразол в дозе 20 мг/кг. (Приложение 13)

Оценку влияния на экссудативную стадию воспаления проводили на модели 1% формалинового отёка в дозах 10 мг/кг, 100 мг/кг при введении экстракта «Розматин» внутривентриально в течение трёх дней до введения формалина и через 1 час после. Препаратом сравнения являлся индометацин – известное нестероидное противовоспалительное средство (таблетки 25 мг «Софарма», Болгария) в дозе 5 мг/кг, который так же вводили внутривентриально по аналогичной схеме (Приложение 13).

Для сравнительной оценки нейротропной активности экстрактов котовников кошачьего (*Nepeta cataria* L.) и крупноцветкового (*Nepeta grandiflora* Vieb.) был проведен биологический скрининг образцов, обладающих дофаминергической активностью с применением тирозингидроксилазной специфической ферментной биотест-системы в условиях опытов *in vitro* (Приложение 14). Также проводилась оценка противовоспалительной активности экстрактов котовника кошачьего и котовника крупноцветкового на основе индуцибельной NO-синтазы (Приложение 15).

Определение параметров острой токсичности сухих экстрактов котовника кошачьего и котовника крупноцветкового проводили по методу Кербера. Изучение влияния курсового (3-4 дня) введения экстрактов котовника кошачьего и котовника крупноцветкового проводили на моделях «приподнятый крестообразный лабиринт» и «хлоралгидратный сон». Препарат сравнения таблетки экстракта пустырника в дозе 100 мг/кг (таблетки, содержащие 14 мг густого экстракта) (Приложение 14).

**ГЛАВА 3. ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ
DRACOCERPHALUM MOLDAVICA L, NEPETA GRANDIFLORA VIEB.,
NEPETA CATARIA L.**

**3.1 Изучение экстрактивных веществ в надземной части змееголовника
молдавского, котовника крупноцветкового, котовника кошачьего**

Подобраны и проведены качественные химические реакции, для обнаружения фенольных соединений в сырье. Для этого использовали спиртовые извлечения. Результаты, представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты, подтверждающие наличие фенольных соединений в сырье

Классы фенольных соединений	Метод и условие анализа	Результат качественной реакции
Флавоноиды	качественные реакции: - цианидиновая проба; - с 3% раствором железа (III) хлорида; - с 5 % раствором алюминия хлорида.	розово-красное окрашивание; -темно-зеленое окрашивание; - желтое окрашивание (желто-зеленая флуоресценция в УФ свете при длине волны 366 нм)
Дубильные вещества	реакция с раствором железом - аммониевых квасцов	-черно-зеленое окрашивание (конденсируемые)

3.2 Обнаружение фенольных соединений

Проведенные качественные химические реакции устанавливают наличие фенольных соединений, что подтверждается данными ЯМР анализа (^1H - и ^{13}C спектры) и данными ВЭЖХ метода в экстрактах из надземной части змееголовника молдавского, котовника крупноцветкового, котовника кошачьего.

Тонкослойная хроматография

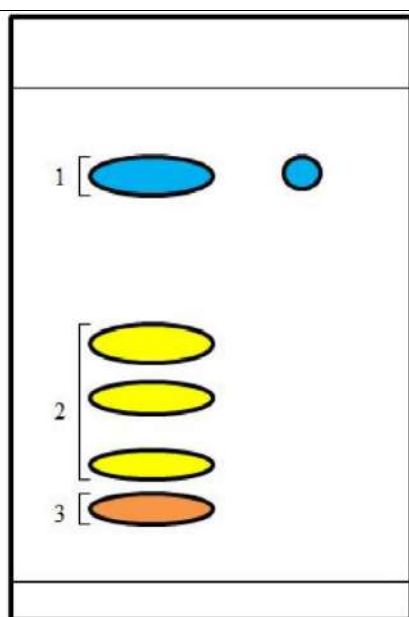


Рисунок 1 – Схема ТСХ-хроматограммы спиртового извлечения из змееголовника молдавского надземной части и раствора СО розмариновой кислоты

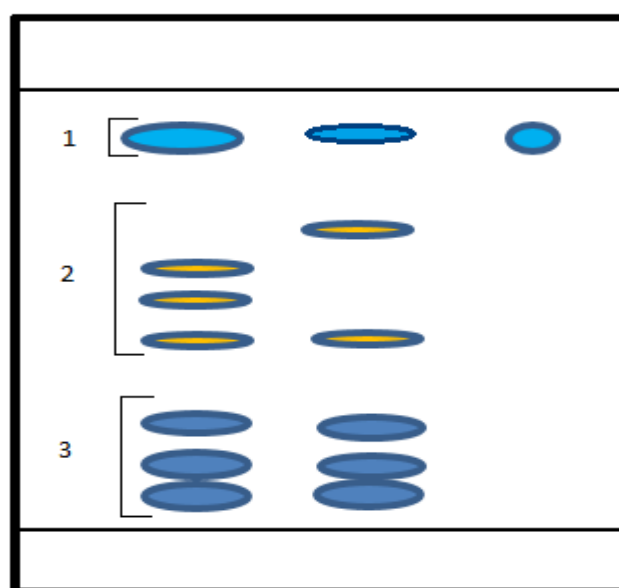


Рисунок 2 – Схема ТСХ-хроматограммы спиртового извлечения из котовника крупноцветкового (1) и котовника кошачьего (2) и раствора СО розмариновой кислоты

На хроматограмме испытуемого раствора обнаруживается зона адсорбции синевато-голубой флюоресценции с R_f около 0,82, аналогичная зоне адсорбции стандартного образца розмариновой кислоты. Также имеется наличие других зон адсорбции (рисунок 1, 2)

УФ-спектрометрия

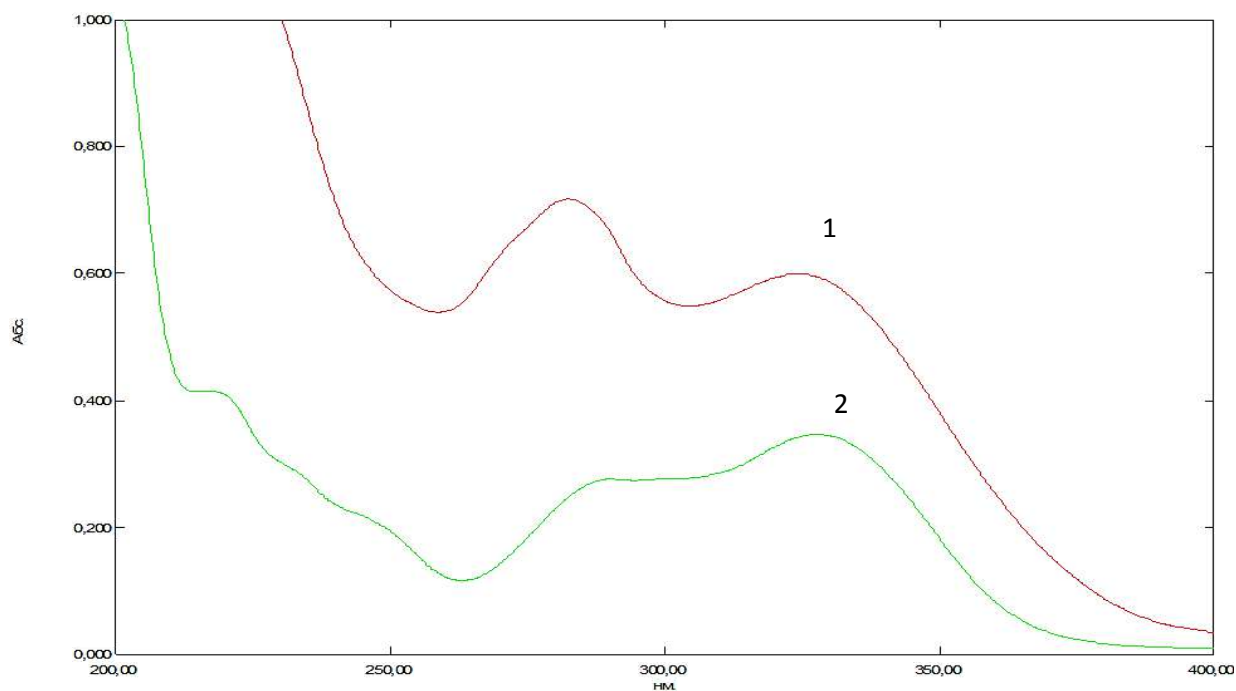


Рисунок 3 – Спектр поглощения спиртового извлечения из змееголовника молдавского травы (1), раствора стандартного образца розмариновой кислоты (2)

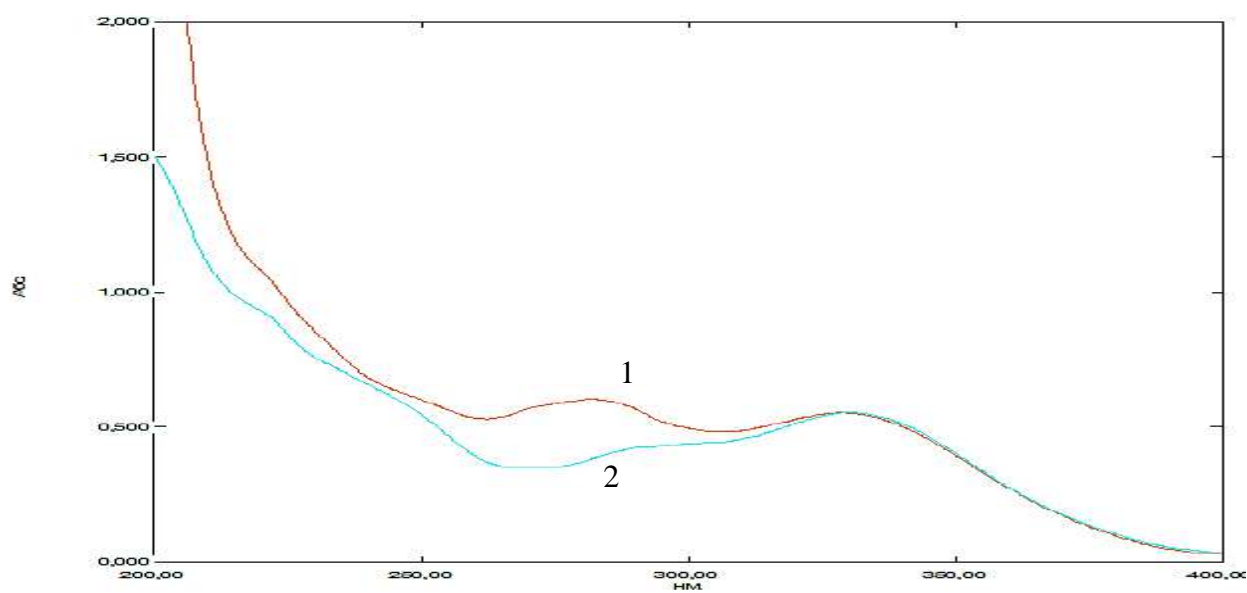


Рисунок 4. Спектры поглощения спиртовых извлечений из котовника крупноцветкового (1) и котовника кошачьего (2)

Для подтверждения наличия фенольных соединения в извлечениях травы змееголовника молдавского, котовника кошачьего и котовника крупноцветкового был проведён спектрофотометрический анализ. В диапазоне 200-400 нм

обнаруживаются два максимума поглощения для змееголовника молдавского 279 нм и 327 нм для котовника кошачьего 270 нм и 330 нм, для котовника крупноцветкового 280 нм и 328 нм. Вид спектров свидетельствует о наличии ароматических колец с гидроксигруппами (оксикоричные кислоты, флавоноиды) (рисунок 4)

3.3. Разработка и валидация методики количественного определения суммы фенольных соединений в траве змееголовника молдавского

При разработке методики количественного определения суммы фенольных соединений был изучен УФ-спектр водно-спиртового извлечения из травы змееголовника молдавского. Согласно полученным данным в диапазоне длин волн от 200 до 400 нм наблюдается два максимума поглощения при 327 ± 2 и 279 ± 2 нм. Аналогичный максимум поглощения при 327 ± 2 соответствует стандартному образцу (СО) розмариновой кислоты (рисунок 3). Полученный результат позволяет проводить количественное определение суммы фенольных соединений в траве змееголовника молдавского в пересчете на розмариновую кислоту.

Экспериментально подобраны оптимальные условия для проведения экстрагирования и количественного определения фенольных соединений в траве змееголовника молдавского (таблицы 3-6). Установлено, что максимальный выход изучаемой группы биологически активных веществ достигается при нагревании на кипящей водяной бане, где экстрагентом является спирт этиловый 50%. На основании подобранных условий (таблицы 3-6), экстрагирование из 1 г (точная навеска) сырья целесообразно проводить 100 мл спирта этилового 50% при измельчении сырья до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм в течение 1 ч.

Таблица 3. Содержание фенольных соединений в зависимости от концентрации, используемого спирта этилового

Концентрация, используемого спирта этилового, %	Количественное содержание фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту, %
40	6,09±0,12
50	6,81±0,13
70	6,16±0,12

Таблица 4. Содержание фенольных соединений в зависимости от соотношения сырье: экстрагент.

Соотношение сырье : экстрагент	Количественное содержание фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту, %
1:50	3,48±0,07
1:150	7,23±0,14
1:200	6,98±0,14

Таблица 5 Содержание фенольных соединений в зависимости от степени измельчения сырья.

Степень измельчения, мм	Количественное содержание фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту, %
0,5	7,11±0,14
1	6,81±0,13
2	6,08±0,12

Таблица 6 Содержание фенольных соединений в зависимости от времени экстракции.

Время, мин	Количественное содержание фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту, %
30	7,01±0,14
60	7,11±0,14
90	7,23±0,14
120	7,36±0,15

Таким образом, подобранные условия позволили разработать методику количественного определения суммы фенольных соединений: аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстия размером 0,5 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 200 мл и добавляют 100 мл спирта этилового 50%, взвешивают с точностью до 0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин.

Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят 50 % спиротом этиловым до первоначальной массы, перемешивают. Извлечение отфильтровывают через бумажный складчатый фильтр «синяя лента» (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл раствора А и доводят объем раствора спиротом этиловым 50% до метки, перемешивают (раствор Б). Оптическую плотность (раствора Б) измеряют на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 327 ± 3 нм. В качестве раствора сравнения используют спирт этиловый 50%.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца (СО) розмариновой кислоты.

Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту (X%) вычисляют по формуле:

$$X\% = \frac{A \cdot 100 \cdot 50 \cdot a_0 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 1 \cdot (100 - W) \cdot A_0 \cdot 100 \cdot 25} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 40000}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)}$$

где:

A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A₀ – оптическая плотность СО розмариновой кислоты;

a – масса навески измельченного сырья, г;

a₀ – масса навески СО розмариновой кислоты, г;

W – потеря в массе при высушивании травы змееголовника молдавского, %.

Валидация проведена по следующим показателям: специфичность, линейность, правильность, внутрилабораторная прецизионность: сходимости и воспроизводимость.

Специфичность методики характеризовали совпадением максимумов поглощения спиртового извлечения из травы змееголовника молдавского и раствора СО розмариновой кислоты при длине волны 327 ± 2 нм.

Определение линейности проводилось на 7 уровнях концентраций СО розмариновой кислоты в диапазоне 2,3 – 10,5 мгк/мл (рисунок 5). По результатам проведенных исследований установлено, что зависимость носит линейный

характер, коэффициент корреляции составил 0,999, что близко к единице и соответствует критерию приемлемости (не ниже 0,995).

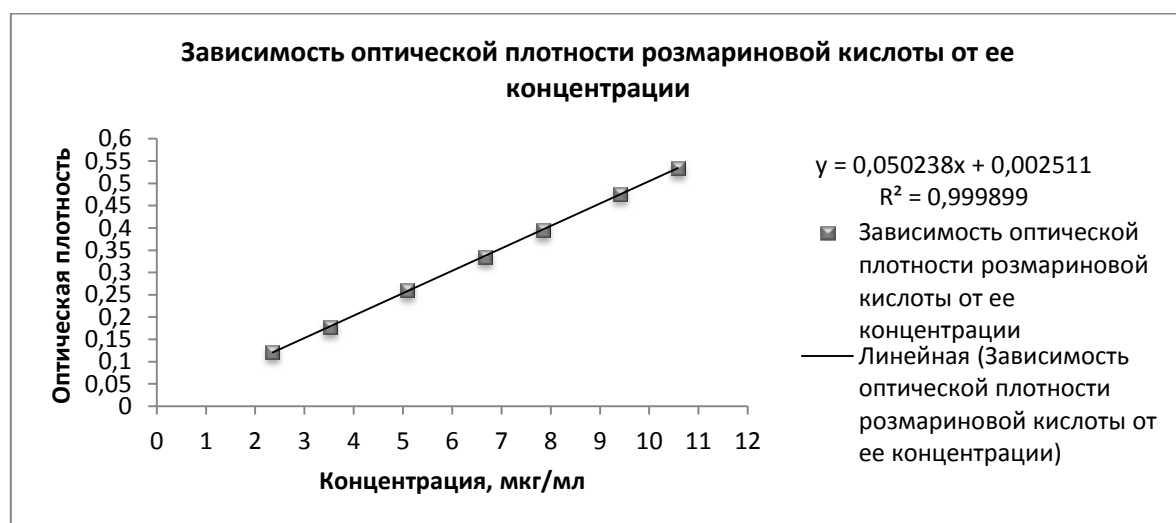


Рисунок 5. График зависимости оптической плотности розмариновой кислоты от её концентрации

Контроль правильности методики проводился на уровнях концентраций 80, 100, 120 % в спиртовом извлечении из сырья змееголовника молдавского (таблица 7).

Таблица 7 – Контроль правильности методики

№ п/п	Найдено, мг	Добавлено СО, мг	Ожидаемое значение, мг	Полученное значение, мг	Абсолютная ошибка, мг	Выход, %
1.1	0,692	0,103	0,795	0,799	-0,004	100,50
2.1	0,692	0,309	1,001	1,032	-0,031	103,09
3.1	0,692	0,515	1,207	1,248	-0,041	103,39
1.2	0,731	0,103	0,834	0,845	-0,011	101,31
2.2	0,731	0,309	1,039	1,064	-0,025	102,40
3.2	0,731	0,515	1,246	1,290	-0,044	103,53
1.3	0,749	0,103	0,852	0,845	0,007	99,17
2.3	0,749	0,309	1,058	1,060	-0,002	100,18

3.3	0,749	0,515	1,264	1,272	-0,008	100,63
Среднее значение выхода, %				101,57		

В разработанной методике процент восстановления (выход) находится в пределах от 99,17% до 103,50%, что отвечает требованиям критерия приемлемости (от 95% до 105%).

Для установления сходимости провели шесть параллельных определений на основании результатов, которых вычислили величину стандартного отклонения ($S=0,144$), относительной вероятной погрешности отдельного измерения ($\pm 1,99\%$) и коэффициента вариации. Значение коэффициента вариации 1,99 % (критерий приемлемости: не более 5%), что свидетельствует о прецизионности методики по сходимости. Внутрилабораторную воспроизводимость определяли два аналитика на шести повторностях образца сырья змееголовника молдавского травы каждый, приготовленных независимо друг от друга в течение двух дней. Полученные значения коэффициента вариации не превышают 2 %, различия между результатами сотрудников статистически незначимы ($F_{\text{факт.}} < F_{\text{табл.}}$), что позволяет считать внутрилабораторную прецизионность результатов приемлемой.

3.4. Изучение накопления суммы фенольных соединений в траве змееголовника молдавского

По разработанной методике определено содержание фенольных соединений в зависимости от мест произрастания и фазы вегетации (таблица 8). Наибольшее содержание фенольных соединений определено в сорте «Нежность».

Таблица 8. Содержание фенольных соединений в траве змееголовника молдавского в зависимости от места произрастания и фазы вегетации

Место произрастания	Фаза вегетации	Содержание фенольных соединений, в пересчете на розмариновую кислоту, %
Средне-Волжский филиал ВИЛАР	Фаза бутонизации	6,05±0,31
	Фаза цветения	7,22±0,36
Северо-Кавказский	Фаза бутонизации	4,95±0,26

филиал ВИЛАР	Фаза цветения	5,81±0,28
Китай	Фаза цветения	6,17±0,32
Московская область	Фаза бутонизации	11,03±0,56
(сорт «Нежность»)	Фаза цветения	10,89±0,56

Выводы по главе 3: по результатам фитохимического анализа в траве змееголовника молдавского, к. крупноцветкового и к. кошачьего обнаружены флавоноиды (флавоного типа), розмариновая кислота и дубильные вещества.

Разработана и проведена валидация методики количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту в траве змееголовника молдавского.

По разработанной методике определили количественное содержание фенольных соединений в траве змееголовника молдавского в зависимости от мест произрастания и фазы вегетации. Наибольшее содержание фенольных соединений определено в сорте «Нежность», выведенном в ФГБНУ ВИЛАР.

ГЛАВА 4. УСТАНОВЛЕНИЕ НОРМ КАЧЕСТВА НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ ЗМЕЕГОЛОВНИКА МОЛДАВСКОГО

4.1 Качественное определение действующих веществ в надземной части змееголовника молдавского

На основании фитохимических исследований в извлечении из травы змееголовника молдавского преобладают флавоноиды и розмариновая кислота.

1. Хроматография в тонком слое (ТСХ).

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции бирюзовой флюоресценции с R_f около 0,82, аналогичная зоне адсорбции стандартного образца розмариновой кислоты. Также имеется наличие других зон адсорбции светло-желтой флюоресценции с R_f около 0,35, 0,51, 0,64; а следующая зона – с ярко-желтой флюоресценцией с бурыми вкраплениями R_f около 0,25

Химическая реакция.

Реакция с $FeCl_3$. При добавлении 2-3 капель 3 % раствора хлорида железа (III) (хлорное железо) должно наблюдаться темно-зеленое окрашивание (фенольные соединения)

4.2 Количественное определение суммы фенольных соединений

Аналитическую пробу сырья измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстия размером 0,5 мм. Около 1 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу вместимостью 200 мл и добавляют 100 мл спирта этилового 50%, взвешивают с точностью 0,01 г. Колбу присоединяют к обратному холодильнику, нагревают на кипящей водяной бане в течение 60 мин. Колбу с содержимым охлаждают до комнатной температуры, взвешивают и при необходимости доводят растворителем до первоначальной массы, перемешивают. Извлечение отфильтровывают через бумажный складчатый фильтр «синяя лента» (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 50 мл помещают 1 мл раствора А и доводят объем раствора спиртом этиловым 50% до метки, перемешивают (раствор Б). Оптическую плотность (раствора Б) измеряют на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 327 ± 3 нм. В качестве раствора сравнения используют спирт этиловый 50%.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца (СО) розмариновой кислоты.

Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту (X%) вычисляют по формуле:

$$X\% = \frac{A \cdot 100 \cdot 50 \cdot a_0 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 1 \cdot (100 - W) \cdot A_0 \cdot 100 \cdot 25} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 40000}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)}$$

где:

A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A₀ – оптическая плотность СО розмариновой кислоты;

a – масса навески измельченного сырья, г;

a₀ – масса навески СО розмариновой кислоты, г;

W – потеря в массе при высушивании травы змееголовника молдавского, %.

По результатам изучения динамики накопления фенольных соединений сырье рациональнее заготавливать в фазу цветения, ориентировочная норма содержания фенольных соединений в сырье – не менее 5,5 %

4.3 Определение показателей качества травы змееголовника молдавского

Фармакопейные показатели качества образцов определяли в соответствии с методиками, изложенными в ГФ РФ XIV: общей золы – ОФС 1.2.2.2.0013.15; золы, нерастворимой в кислоте хлористоводородной – ОФС 1.5.3.0005.15 и влажности – ОФС 1.5.3.0007.15 (Таблица 9)

Таблица 9. Результаты анализа травы змееголовника молдавского

№п/п	Характеристика образцов	Наименование показателей						
		Влажность, %	Зола общая	Зола нерастворимая в HCl	Стебли в т.ч. отделенные при анализе	Листья измен. окраску (побур., пожелт.)	Органическая примесь	Минеральная примесь
1.	Северо-Кавказский филиал ФГБНУ ВИЛАР, фаза бутонизации, урожай 2016 г.	6,92	9,13	0,95	40,91	0,23	0,58	0,00
2.	Северо-Кавказский	7,22	8,62	0,57	41,59	1,27	0,08	0,42

	филиал ФГБНУ ВИЛАР, фаза бутонизации, урожай 2016 г.							
3.	Фаза бутонизации, урожай 2018, Северо- Кавказский ФГБНУ ВИЛАР (дата отбора 13.11.2018)	8,73	6,57	0,55	33,44	6,05	0,35	0,00
4.	Фаза цветение, урожай 2018, Северо- Кавказский ФГБНУ ВИЛАР (дата отбора	3,59	8,81	0,67	38,40	1,00	2,08	0,00

	25.06.2019)							
5.	Фаза бутонизации, урожай 2018, Северо- Кавказский ФГБНУ ВИЛАР (дата отбора 25.06.2019)	3,22	9,79	0,77	41,95	5,59	0,76	0,00

В результате проведенных анализов, было установлено, что цельное сырье змееголовника молдавского имеет следующие показатели качества: влажность не более 14 %; золы общей не более 10 %; золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте, не более 3 %; стеблей, в т.ч отделенных при анализе, не более 45 %; листьев изменивших окраску (пожелтевших, потемневших и почерневших) не более 7 %; органической примеси не более 2 %; минеральной примеси не более 1 %.

Выводы к Главе 4

Определены нормы качества травы змееголовника молдавского. Предложены методики подтверждения подлинности с помощью качественной реакции и ТСХ со стандартным образцом розмариновой кислоты и методика количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту.

По результатам изучения накопления фенольных соединений в сырье рациональнее заготавливать в фазу цветения. Определена ориентировочная норма содержания фенольных соединений в сырье – не менее 5,5 %.

ГЛАВА 5. ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ РАСТЕНИЙ РОДА *NEPETA* L.

5. 1. Сравнительный морфолого-анатомический анализ котовника крупноцветкового и котовника кошачьего

Одним из основных методов идентификации лекарственного растительного сырья является метод морфолого-анатомического анализа. Нами проведено сравнительное морфолого-анатомическое изучение надземной части котовника кошачьего и котовника крупноцветкового для выявления характерных диагностических признаков.

Таблица 10. Сравнительная характеристика внешних (морфологических) признаков сырья котовника кошачьего и котовника крупноцветкового

Основные признаки цельного сырья		
Часть сырья	<i>Nepeta cataria</i> L.	<i>Nepeta grandiflora</i> Vieb.
Стебель	Прямой, ветвистый, четырехгранный	
Цвет стебля	От светло-зеленого до зеленого	От серовато-зеленого до зеленовато-фиолетового
Форма и край листовой пластинки	Треугольно-серцевидно-яйцевидная, по краю крупнопильчатая	Яйцевидная или продолговато-яйцевидная, с сердцевидным основанием, чаще остроконечная, по краю мелко городчато-зубчатая или городчатая
Черешок	Длиной до 7 мм	Черешки нижних листьев длиной до 2 см, верхних - 0, 2-0, 3 см
Соцветие	Густые сложные полусонтики	Полусонтики большей частью сложные, на цветоносах длиной 2-3 см.
Венчик	Длиной до 10 мм, беловатый с пурпурными точками на нижней губе	Длиной до 18 мм, фиолетово-синий
Чашечка	Длиной 2-6 мм с зубцами, зеленая	Длиной до 1 см с узкотреугольными, короткими, острыми зубцами, фиолетово-синяя, густо и головчато железистая

Измельченное сырье представляет собой кусочки стеблей, листьев, соцветий, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм

Признаки измельченного сырья		
Часть сырья	<i>Nepeta cataria</i> L.	<i>Nepeta grandiflora</i> Bieb.
Цвет измельченного сырья	Зеленый, с желтовато-белыми вкраплениями	Зеленый, серовато-зеленый с фиолетовыми, темно-пурпурными, коричневыми вкраплениями
Цвет кусочков листьев	Зеленый, светло-зеленый	Серовато-зеленый, зеленый
Цвет кусочков стеблей	Зеленый, светло-зеленый	серовато-зеленый, зеленовато-фиолетовый
Цвет венчика или его части	Желтовато-беловатый	Фиолетово-синий
Цвет чашечки	Зеленый	Фиолетово-синий

При макроскопическом изучении травы котовника кошачьего и котовника крупноцветкового были определены морфологические признаки сырья. Установлено, что у обоих видов котовника стебли прямые, ветвистые, четырехгранные, опушенные; листья черешковые, опушенные с обеих сторон; черешок листа тонкий, изогнутый, желобчатый, опушенный; венчик двугубый в 1,5-2 раза длиннее чашечки, чашечка трубчатая, опушенная.

Наряду с этим, у исследованных видов котовника были выявлены отличительные морфологические признаки такие как: цвет стеблей; форма и край листовой пластинки; длина черешка; цвет и длина венчика и чашечки.

Основные различия анатомических признаков для исследуемых образцов сырья (Таблица 11)

Таблица 11. Анатомио-диагностические признаки эпидермиса различных частей травы котовников кошачьего и крупноцветкового

Часть сырья	Котовник кошачий	Котовник крупноцветковый
Лист	Клетки верхнего эпидермиса со слабоизвилистыми или почти прямыми стенками, нижнего - клетки мельче с сильноизвилистыми	Клетки верхнего и нижнего эпидермиса с извилистыми стенками. Устьица на обеих сторонах листа, окружены

	стенками. Устьица присутствуют на обеих сторонах листа, на нижней – многочисленные и сопровождаются двумя околоустьичными клетками, расположенными перпендикулярно устьичной щели (диацитный тип), встречаются устьица аномоцитного типа (рисунок 6а, 7а)	двумя клетками эпидермиса, расположенными перпендикулярно устьичной щели (диацитный тип). Вокруг устьиц местами заметна складчатость кутикулы (рисунок 6б, 7б)
Стебель	Эпидермис стебля состоит из многоугольных или слегка вытянутых клеток с прямыми четковидноутолщенными стенками и устьицами, ориентированными по длине стебля. Вокруг устьиц заметна складчатость кутикулы. Клетки эпидермиса по ребрам длиннее и более узкие (рисунок 11а).	Эпидермис стебля состоит из многоугольных или слегка вытянутых клеток с прямыми, местами четковидноутолщенными стенками и устьицами, ориентированными по длине стебля. Вокруг устьиц местами заметна складчатость кутикулы. Клетки эпидермиса по ребрам длиннее и более узкие (рисунок 12б).
Чашечка	Эпидермис состоит из продольно-вытянутых клеток с извилистыми, местами четковидноутолщенными стенками; заметна складчатость кутикулы, встречаются устьица (рисунок 19а)	Эпидермис состоит из продольно-вытянутых клеток с извилистыми стенками и складчатостью кутикулы, встречаются устьица (рисунок 19б)
Венчик	Клетки эпидермиса имеют извилистые стенки, по краю эпидермис венчика покрыт сосочковидными выростами (рисунок 23а, 23б, 24)	



Рисунок 6а – Фрагмент нижнего эпидермиса листа котовника кошачьего (ув. x400)



Рисунок 6б – Фрагмент нижнего эпидермиса листа котовника крупноцветкового (ув. x400)

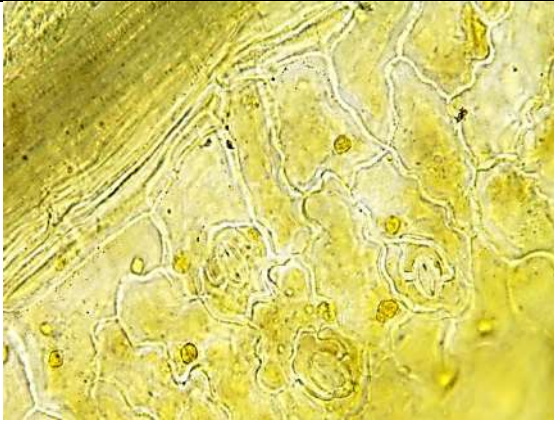


Рисунок 7а – Фрагмент верхнего эпидермиса листа котовника кошачьего (ув. x400)

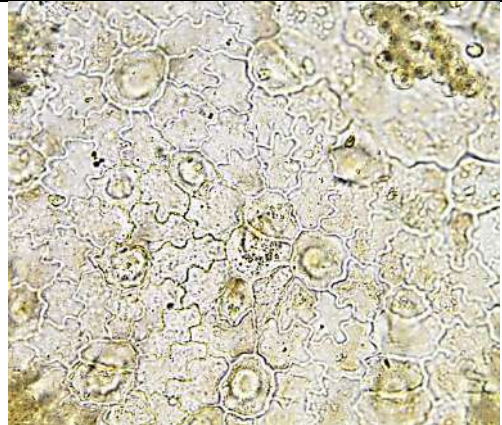


Рисунок 7б – Фрагмент верхнего эпидермиса листа котовника крупноцветкового (ув. x400)



Рисунок 8а – Волоски на жилке листа котовника кошачьего (ув. x200)



Рисунок 8б – Волоски верхнего эпидермиса листа котовника крупноцветкового (ув. x400)

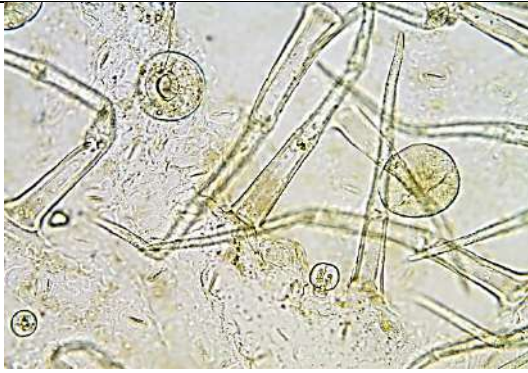


Рисунок 9а – Волоски и железки
нижнего эпидермиса листа котовника
кошачьего (ув. х400)



Рисунок 10б – Волоски и железки
нижнего эпидермиса листа
котовника крупноцветкового (ув.
х400)



Рисунок 11а – Фрагмент эпидермиса
стебля котовника кошачьего (ув. х400)

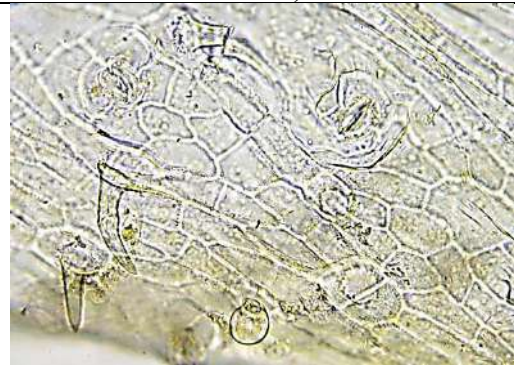


Рисунок 12б – Фрагмент эпидермиса
стебля котовника крупноцветкового
(ув. х400)

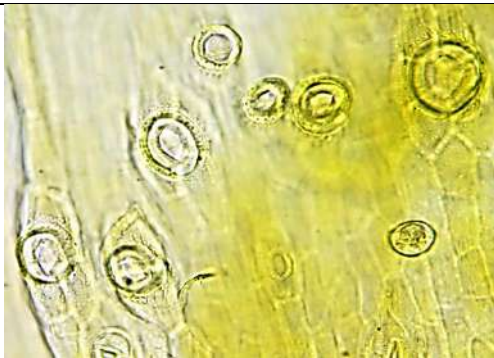


Рисунок 13 – Места прикрепления
волосков стебля (ув. х400)



Рисунок 14. Железки и складчатость
кутикулы вокруг устьица
эпидермиса стебля котовника
кошачьего (ув. х400)



Рисунок 15 – Простые волоски эпидермиса стебля котовника кошачьего (ув. x200)

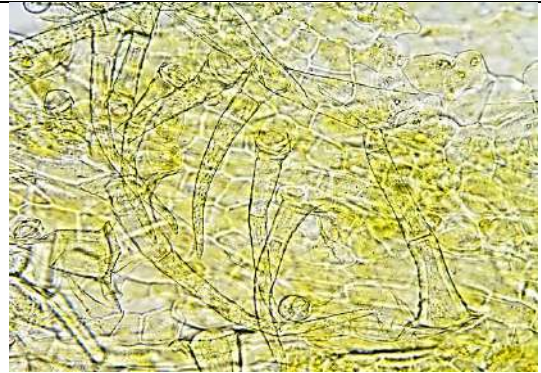


Рисунок 16 – Простые волоски эпидермиса стебля котовника кошачьего (ув. x400)



Рисунок 17 – Сосочковидные волоски эпидермиса стебля котовника крупноцветкового (ув. x400)



Рисунок 18 – Головчатые волоски эпидермиса стебля котовника крупноцветкового – вид сверху (ув. x 400)



Рисунок 19 а – Фрагмент эпидермиса чашечки с простыми многоклеточными волосками котовника кошачьего (ув. x400)

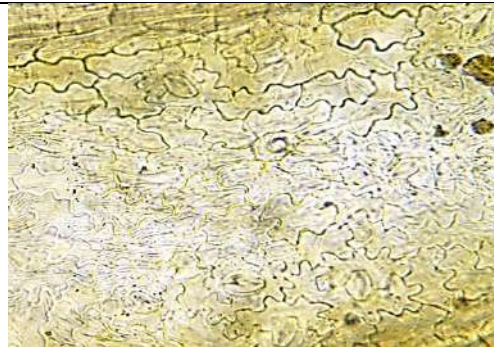


Рисунок 19 б – Фрагмент эпидермиса чашечки котовника крупноцветкового (ув. x400)



Рисунок 20 а – Волоски по краю чашечки котовника кошачьего (ув. x200)



Рисунок 20 б– Головчатые и простые волоски эпидермиса чашечки котовника крупноцветкового (ув. x200)



Рисунок 21 а – Головчатые волоски на многоклеточной ножке эпидермиса чашечки у котовника крупноцветкового (ув. x400)

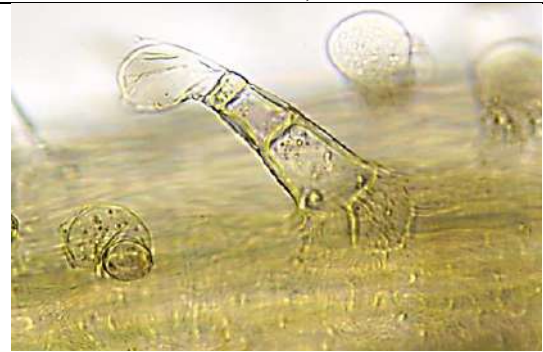


Рисунок 22 б– Головчатый волосок на трехклеточной ножке эпидермиса чашечки котовника крупноцветкового (ув. x400)



Рисунок 23 а – Фрагмент эпидермиса трубки венчика котовника кошачьего (ув. x400)

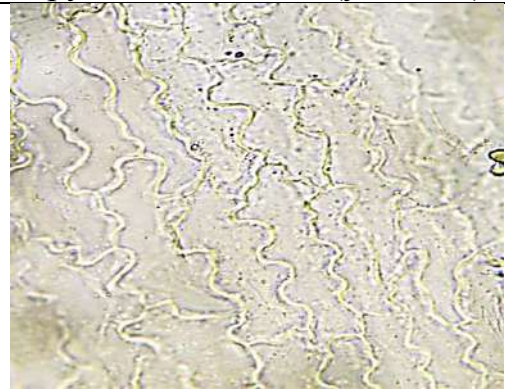


Рисунок 23 б – Фрагмент эпидермиса венчика котовника крупноцветкового (ув. x400)



Рисунок 24 – Сосочковидные выросты венчика (ув. x400)



Рисунок 25 – Простые волоски эпидермиса венчика у котовника кошачьего (ув. x400)



Рисунок 26 – Пальцевидные волоски (ув. x400)

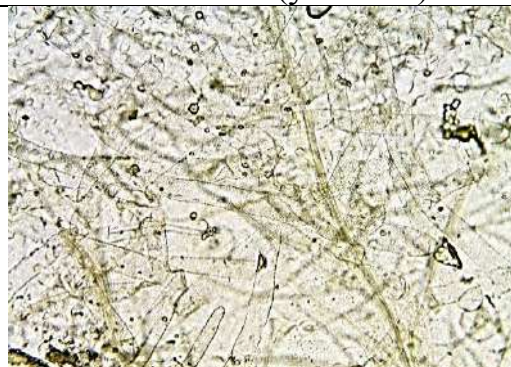


Рисунок 27 – Пальцевидные волоски (ув. x200)



Рисунок 28 – Простой, бородавчатый волосок со спавшийся клеткой у котовника кошачьего

Таким образом, в ходе проведенных микроскопических исследований надземной части котовника кошачьего и котовника крупноцветкового установлено, что эпидермис листа имеет диацидный устьичный комплекс, эфирномасличные железы округлой формы с 4(6) радиально расположенными выделительными клетками. В местах прикрепления простых волосков и железок клетки эпидермиса образуют розетку. При опадении простых волосков на эпидермисе стебля остаются характерные валики, часто с зубчатым краем оболочки (рисунок 13). Для венчика характерны волоски пальцевидной формы со штриховатой кутикулой (рисунок 26, 27).

У котовника крупноцветкового встречаются три типа волосков: простые многоклеточные, головчатые и мелкие сосочковидные. Простые волоски 1-3 (4)-клеточные, бородавчатые, могут быть прямые и изогнутые; головчатые волоски на короткой одноклеточной ножке с 1-2-клеточной головкой. Для чашечки также характерны простые 1-5 (8)-клеточные, бородавчатые волоски и головчатые волоски двух типов: на короткой одноклеточной ножке с 1-2-клеточной округлой или вытянутой головкой и на длинной 1-3 (5)-клеточной ножке с округлой одноклеточной головкой (рисунок 8б, 10б, 18, 17, 20б, 22б).

Волоски котовника кошачьего представлены двумя типами: простыми 2-4 (6)-клеточными, бородавчатыми, иногда с отдельными спавшимися клетками, прямыми и изогнутыми и головчатыми на короткой одноклеточной ножке с 1-2-клеточной округлой головкой (рисунок 8а, 6а, 15, 19 а, 20а, 25).

5.2. Изучение химического состава различных извлечений из котовника крупноцветкового и котовника кошачьего

Идентификация фенольных соединений методом ВЭЖХ

Содержание розмариновой кислоты в бутанольной фракции экстракта котовника кошачьего равно 0,90 %, котовника крупноцветкового – 5,66 %

Времена удерживания и максимумы поглощения стандартных растворов указаны в таблице 12

Таблица 12. Времена удерживания стандартных растворов

БАВ	Время удерживания (мин)	Максимум поглощения (нм)
Кверцетин	32,51	370
Рутин	18,34	354
Лютеолин-7-гликозид	18,81	348
лютеолин	32,37	348
П-кумаровая кислота	18,25	309
Апигенин	35,42	336
Феруловая кислота	19,98	322
Кумарин	27,60	276
Кофейная кислота	13,08	323
Цикориевая кислота	23,82	330

Хлорогеновая кислота	10,26	326
Салициловая кислота	4,61	271
Розмариновая кислота	25,72	329

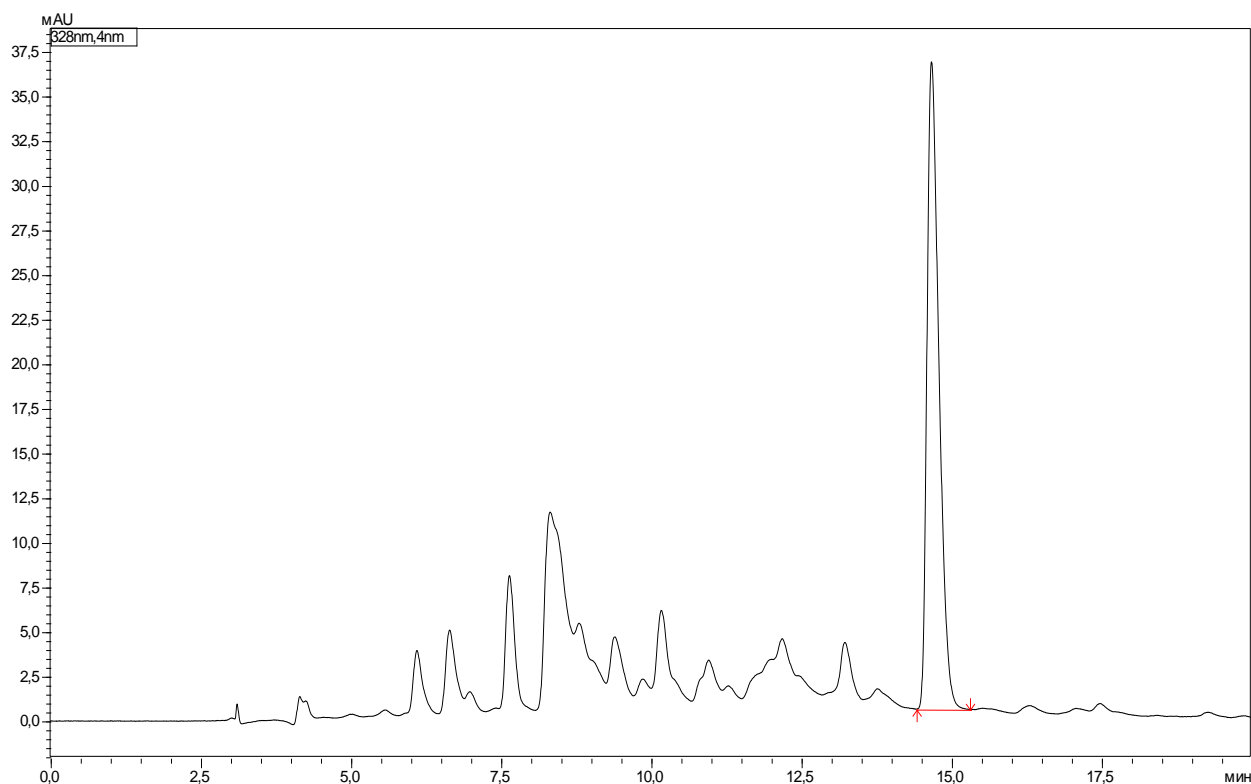


Рисунок 29. ВЭЖХ-Хроматограмма. Котовник крупноцветковый. Компонентный состав бутанольной фракции из травы

По данным ВЭЖХ исследования установлено, что в бутанольной фракции котовника крупноцветкового обнаружены следующие фенольные соединения: салициловая кислота, фенолпропаноиды - хлорогеновая, кофейная, п-кумаровая, розмариновая кислоты, флавоноиды – кверцетин, рутин, лютеолин-7-глюкозид, лютеолин и апигенин. В экстракте преобладает розмариновая кислота – 5,66 %.

В бутанольной фракции котовника кошачьего – п-кумаровая, розмариновая, феруловая, кофейная, хлорогеновая кислоты, рутин, лютеолин. Следует отметить, что содержание розмариновой кислоты не превышает 1 %.

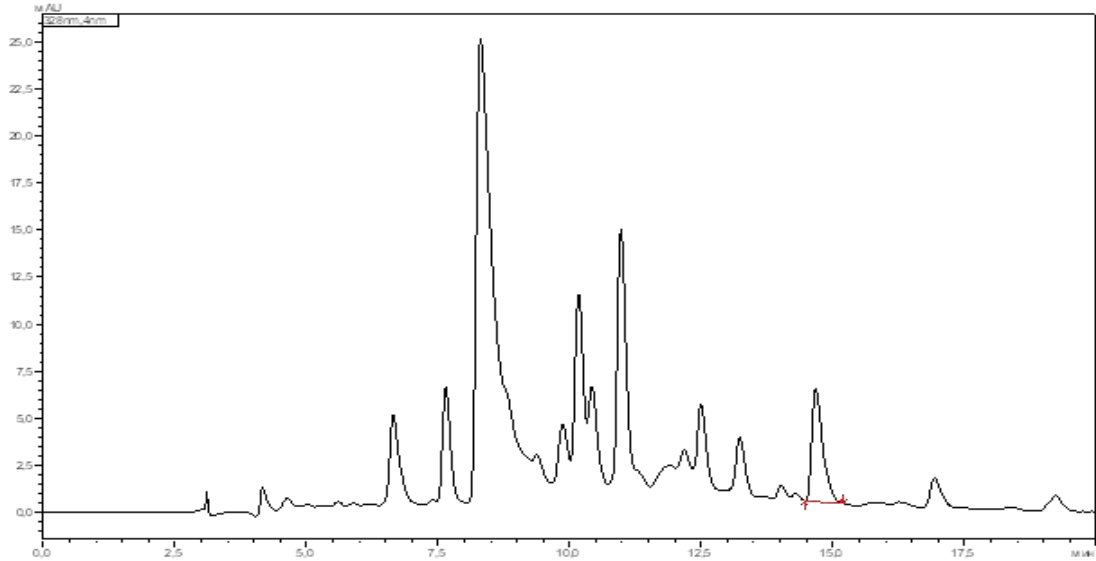


Рисунок 30. ВЭЖХ-Хроматограмма. Котовник кошачий. Компонентный состав бутанольной фракции из травы

Идентификация фенольных соединений методом ЯМР-спектроскопии

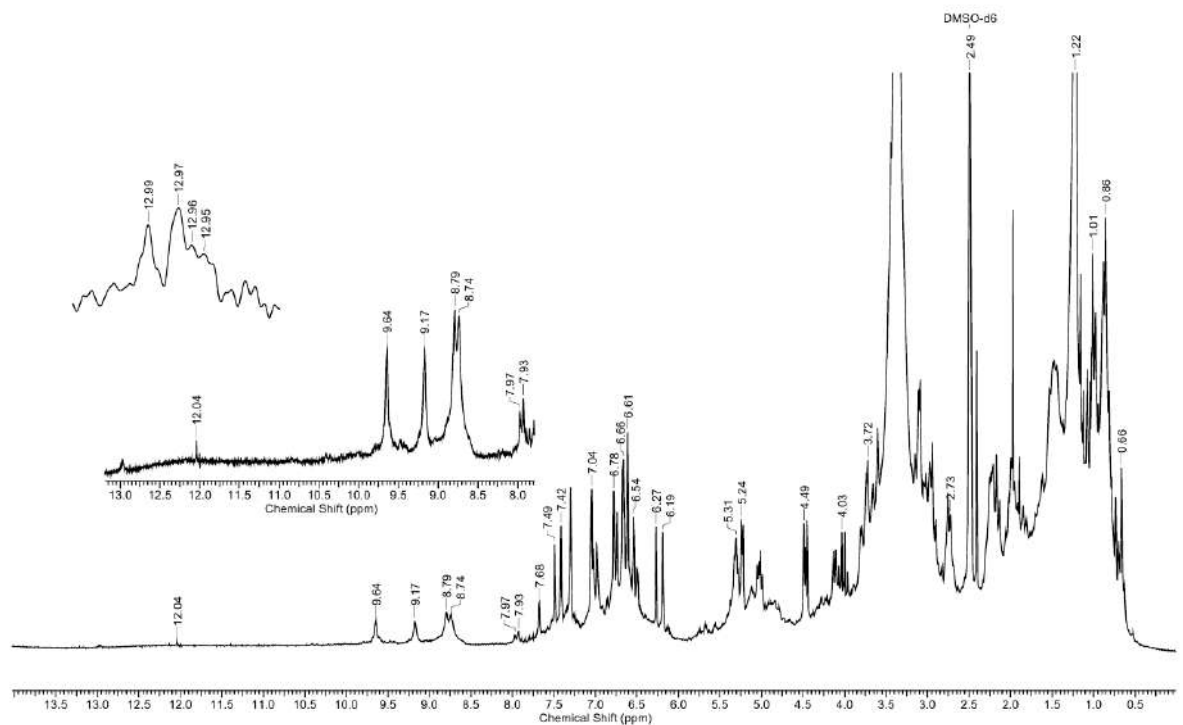


Рисунок 31. Спектр ^1H ЯМР этилацетатной фракции котовника крупноцветкового

Котовник крупноцветковый. Доминирует розмариновая кислота, в минорных количествах апигенин (синглет при 12,97, дублет 7,95 $J=8$ Гц), цинарозид (синглет 12,99 м.д.) и флавоны (12,04 синглет)

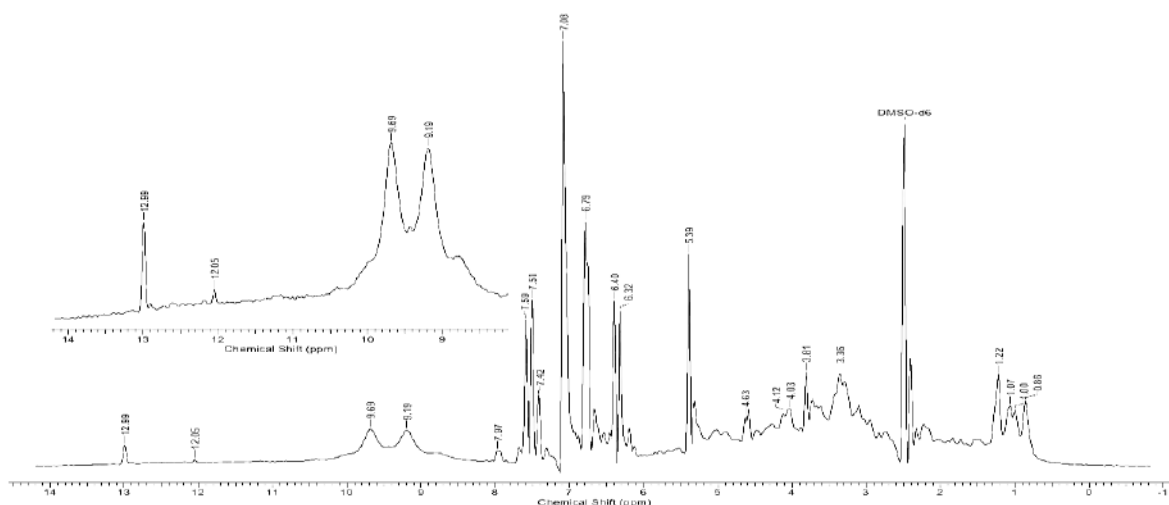


Рисунок 32 Спектр ^1H ЯМР этилацетатной фракции котовника кошачьего **Котовник кошачий**. Преобладает вещество, принадлежащее к оксикоричным кислотам, строение которого близко к кофеилтартроновой кислоте (5,39 синглет, 6,36 м.д. дублет $J=16,0$ Гц, 7,08 синглет, 7,55 $J=16,0$ Гц, синглет 9,19 и синглет 9,69 м.д.). Также имеются сигналы, принадлежащие розмариновой кислоте. Среди флавоноидов: цинарозид (лютеолин-7-О-глюкозид) и вещество, принадлежащее к флавоноидам флавоного типа.

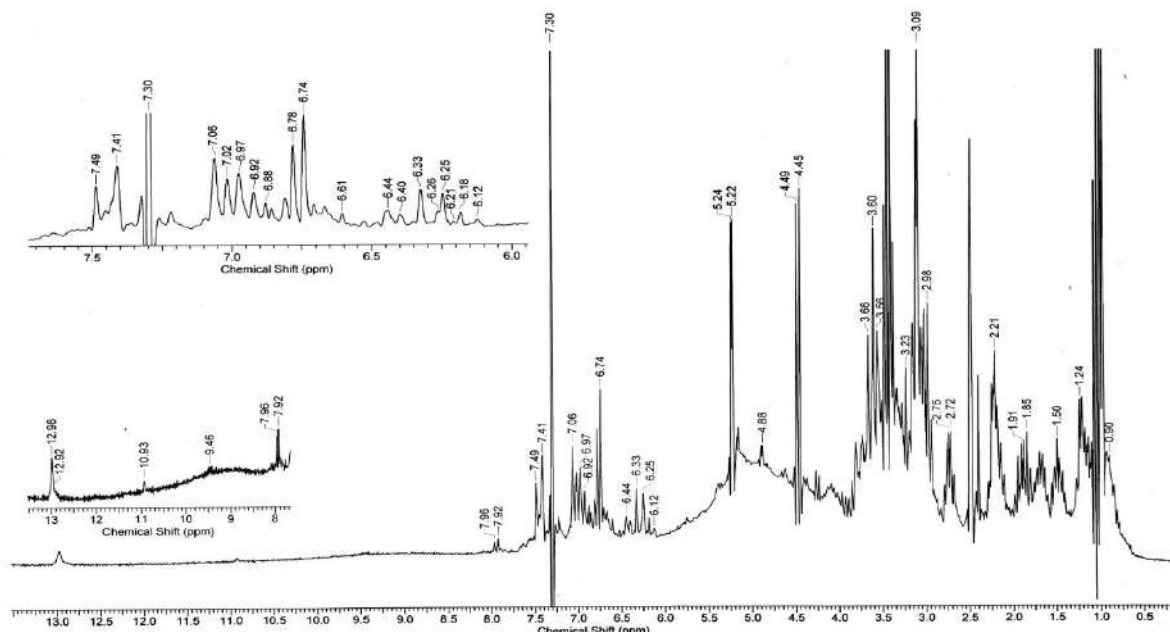


Рисунок 33 ^1H -ЯМР-спектр бутанольной фракции- котовника кошачьего (DMSO).

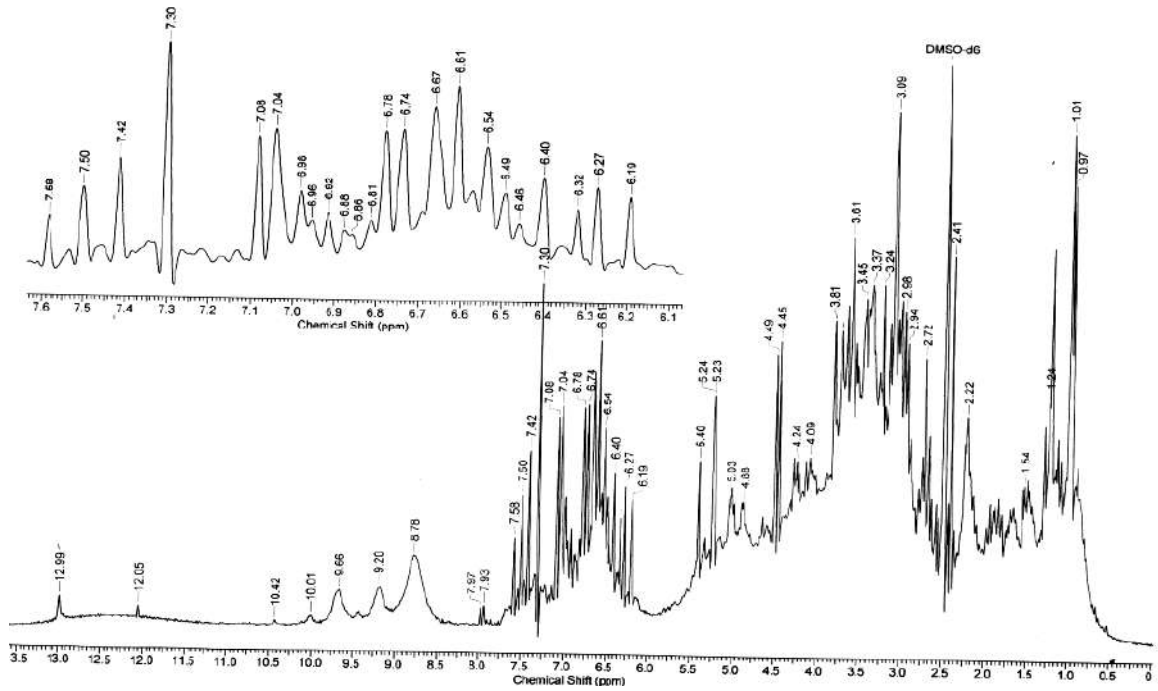


Рисунок 34 ^1H -ЯМР-спектр бутанольного извлечения котовника крупноцветкового (DMSO).

На рисунке 34 показан ^1H -ЯМР-спектр бутанольного извлечения котовника кошачьего (DMSO). По данным ЯМР спектра в бутанольной фракции содержатся флавоноиды флавонового типа: апигенин (в области слабого поля наблюдаются сигналы протонов 12,92; 7,94 дублет), лютеолин (12,98), иридоидный гликозид-1,5,9,-эпидеоксилогановая кислота (к этой кислоте относятся сигналы при 7,30 м. д.; 5,23; 4,47).

Кроме того имеются три оксикоричные кислоты в области 6,10 и 6,35. Также по данным ЯМР спектра в бутанольной фракции котовника крупноцветкового присутствуют иридоидные гликозиды

Идентификация иридоидного гликозида 1,5,9 –эпидезоксилогановой КИСЛОТЫ

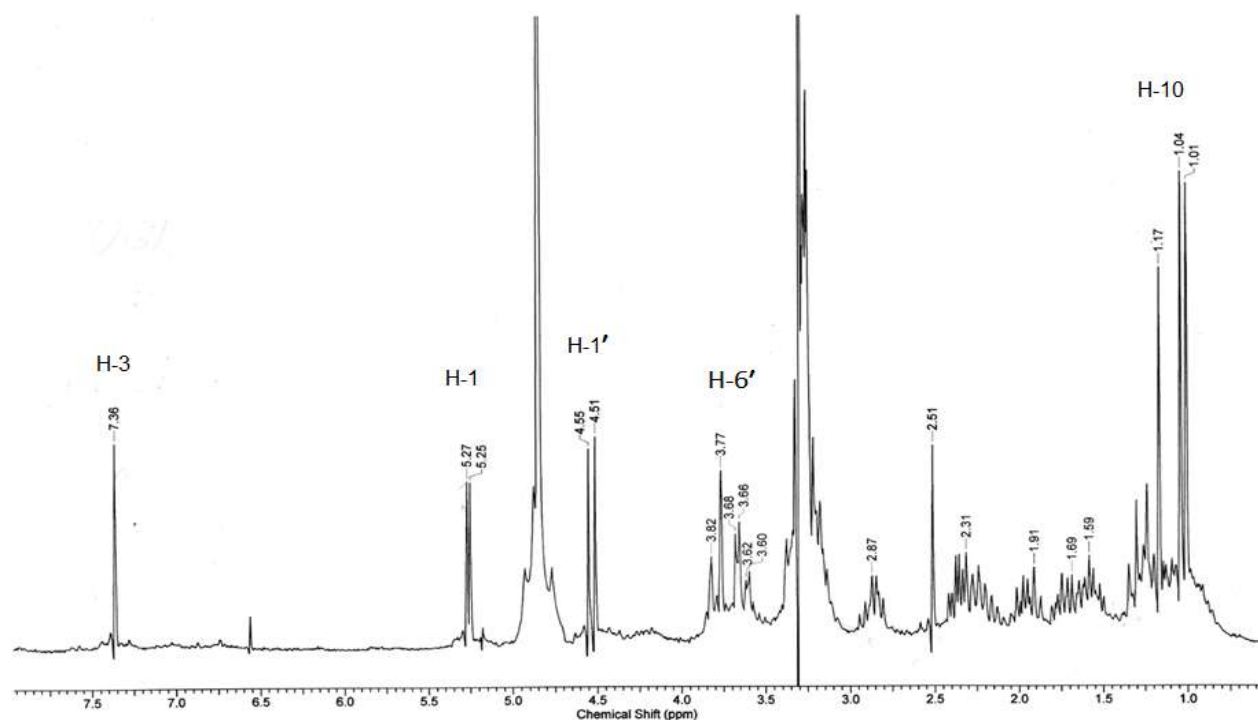


Рисунок 35. ^1H -ЯМР-спектр фракции (4-6) после колонки №2

На рисунке 35 Показан ^1H -ЯМР-спектр фракции (4-6) после колонки № 2 В Д₂О. По данным ЯМР наблюдаются сигналы хелатных протонов Н-1 дублет 5,27 м.д, Н-10 дублет 1,03 и Н-1'-4,55 и Н-3 7,36 Н-6' 3,77 и 3,64 кватрет. Сигнал при Н-3 7,36 м.д, представляющий собой синглет может быть использован для идентификации иридоидов в смеси веществ

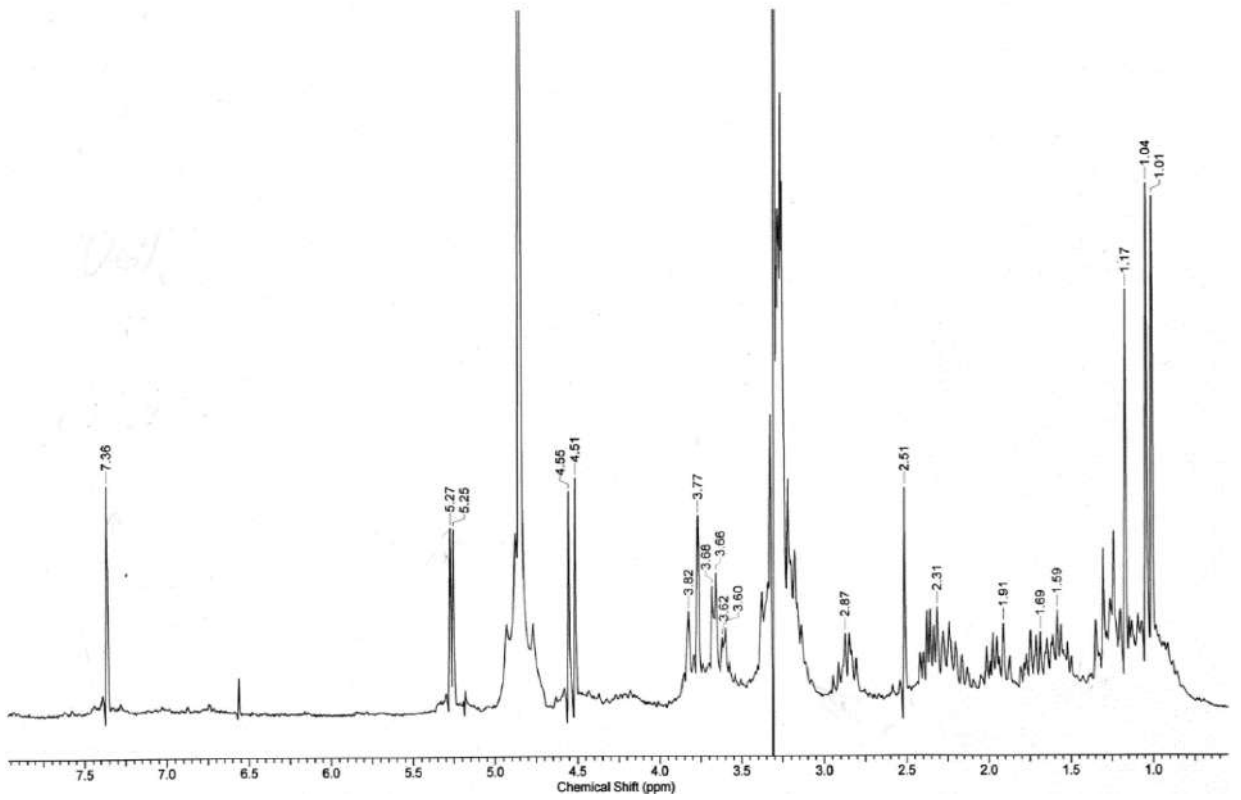


Рисунок 36. ^1H -ЯМР-спектр фракции (4-6) после колонки №2

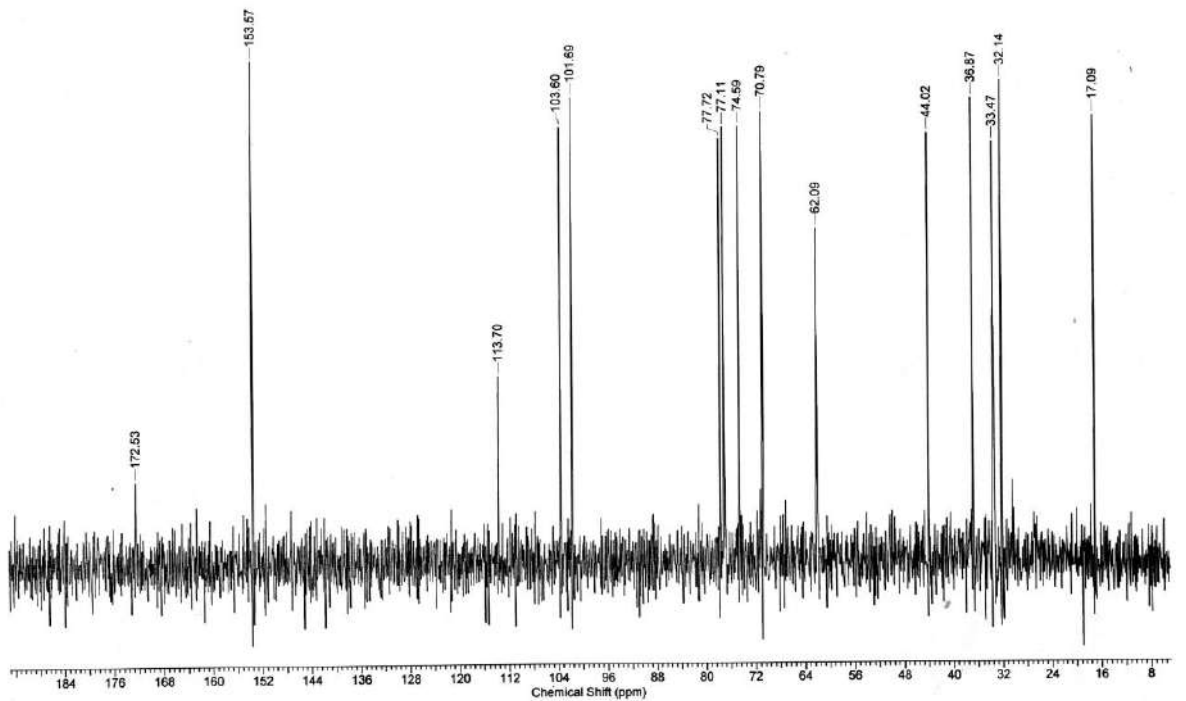


Рисунок 37. ^{13}C -ЯМР –спектр фракции (4-6) после колонки №2

На рисунке 37 Показан ^{13}C ЯМР –спектр фракции (4-6) после колонки №2
Химические сдвиги сигналов углерода выделенного вещества в растворителях D_2O , CD_3OD , DMCO приведены в таблице 13

Идентификация проводилась путем сравнения химических сдвигов сигналов ^{13}C ЯМР спектров полученного вещества со спектром, приведенным в литературе [119].

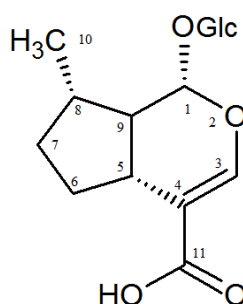


Рисунок 38. Формула 1,5,9-эпидезоксилогановой кислоты

Таблица 13. Химические сдвиги углеродов 1,5,9 эпидезоксилогановой кислоты в растворителях D_2O , CD_3OD , DMCO в сравнении с литературными данными

Углерод	D_2O	CD_3OD	DMCO	Литературные данные (D_2O)
1	101,89	100,86	98,40	101,49
3	153,57	153,14	150,94	153,57
4	113,70	113,42	111,67	113,36
5	33,47	34,10	32,59	33,58
6	32,14	32,33	30,82	32,09
7	33,47	33,64	32,00	33,38
8	36,87	37,23	35,28	36,82
9	44,02	44,36	42,43	43,89
10	172,53	170,87	167,90	172,09
1'	103,60	103,90	102,12	103,49
2'	74,59	75,26	73,94	74,42

3'	77,11	78,13	73,97	76,96
4'	70,79	71,20	69,65	70,57
5'	77,72	78,33	77,26	77,54
6'	62,09	62,58	60,89	61,95

5.3 Компонентный состав эфирного масла котовника кошачьего в зависимости от мест произрастания

Были изучены образцы котовника кошачьего травы, собранные в трех климатических зонах (Белгородская область, Московская область, Северо-Кавказский регион) с целью определения компонентного состава эфирного масла (Таблица 14). Образцы заготовлены в фазу массового цветения.

Таблица 14. Компонентный состав эфирного масла котовника кошачьего в зависимости от места произрастания

Наименование компонентов	Содержание компонентов в образцах (%)		
	Белгородская область	Московская область	Северо – Кавказский регион
α -Пинен	0,224	0,059	0,172
Сабинен	0,428	-	-
Сантолина эпоксид	0,059	-	-
<i>цис</i> -Оцимен	0,142	-	0,250
<i>транс</i> - Оцимен	0,344	-	0,792
β -Терпинеол	0,014	-	0,213
β -Пинен оксид	0,155	-	0,039
α -Пинен оксид	-	-	0,030
<i>транс</i> -Пинокарвеол	0,031	-	0,023
<i>транс</i> -Хризантемаль	0,448	-	0,050
(R)-(+)-Цитронеллаль	1,276	-	0,225
Цитронеллол	-	-	1,726
<i>цис</i> -Вербенол	0,051	-	-
α -Циклогераниол	0,334	-	-
Нераль	2,029	-	0,321
Изогераниол	0,138	-	-
Гераниол	-	-	1,104
Изопулегол	0,035	-	0,022

Сквален	21,31	-	0,044
Гераниаль	3,435	-	-
Цитронеллил формат	0,111	-	-
Геранил формат	0,114	-	0,020
Пиперитон	-	-	0,090
R-(+)-цитронеллаль	0,081	-	-
Вербенон	0,197	-	-
Кариофиллен	4,421	1,508	1,203
<i>цис</i> - β -Фарнезен	0,133	-	0,197
α -Гумулен	0,487	-	0,148
α -Фарнезен	0,035	0,161	-
Фенхон	0,048	-	-
O-Ксилен	-	-	0,057
(-)-бета-Пинен	1,497	-	-
1,3-Диэтилбензол	-	0,023	-
δ -3-Карен	-	0,013	-
1,4 - Диэтилбензол	-	0,034	-
1,2-Диэтилбензол	-	-	0,054
<i>цис</i> -Пинан	-	0,010	-
Непеталактон	-	0,357	7,530
Изодигидронепеталактон	-	0,034	-
α -Гумулен	-	0,137	-
R-Лимонен	0,042	0,008	-
Кариофиллен оксид	0,051	0,939	1,294
Гумулена эпоксид II	-	0,247	-
Фитола ацетат	0,923	2,485	-
Фитол	0,175	0,885	1,820
α -Туйон	-	-	0,034
β -Туйон	-	-	0,031
β -Фелландрен	-	-	0,393
Мирцен	-	-	0,025
Цитраль	-	-	0,494
<i>транс</i> -Сабинен гидрат	-	-	0,529
<i>транс</i> -Линалоксид	-	-	0,177

В соответствии с данными таблицы 14 основным компонентом эфирного масла котовника кошачьего, произрастающего в Северо-Кавказском регионе, является непеталактон, в Московской области – кариофиллен, в Белгородской области – гераниаль. Эфирное масло, полученное из сырья, произрастающего в Северо-Кавказском регионе, имеет наибольшее количество компонентов в

эфирном масле. Следует заметить, что непеталактон отсутствует в сырье, произрастающем в Белгородской области.

Выводы по главе 5. Определены морфолого-анатомические признаки различных частей травы котовника кошачьего и котовника крупноцветкового (лист, стебель, чашечка, венчик), имеющие диагностическое значение и позволяющие устанавливать подлинность этих видов сырья.

Сравниваемые виды котовника можно отличить по следующим установленным морфологическим признакам: форма и край листовой пластинки, цвет стеблей, длина черешка; цвет и длина венчика и чашечки.

Наиболее важными микродиагностическими признаками для идентификации растительного сырья, по которым были охарактеризованы исследованные объекты, являются форма клеток эпидермиса; наличие кутикулы; присутствие, расположение и тип устьиц; строение волосков и железок.

В ходе исследования выявлены отличительные признаки в анатомическом строении надземной части котовника кошачьего и котовника крупноцветкового: клеточные стенки эпидермиса листа у котовника кошачьего от почти прямых до сильноизвилистых, а у котовника крупноцветкового – извилистые; у котовника крупноцветкового, в отличие от котовника кошачьего, имеются головчатые волоски на длинной многоклеточной ножке и мелкие сосочковидные волоски.

Определен химический состав извлечений из травы котовника кошачьего и котовника крупноцветкового. Из котовника кошачьего выделен иридоидный гликозид – 1,5,9-эпидезоксилогановая кислота, который является преобладающим компонентом. В извлечениях котовника крупноцветкового обнаружены такие биологически активные вещества как салициловая, хлорогеновая, кофейная, п-кумаровая, розмариновая кислоты, лютеолин-7-глюкозид, лютеолин и апигенин, кверцетин, рутин среди которых преобладающим компонентом является розмариновая кислота. Определен химический состав эфирного масла котовника кошачьего в зависимости от места произрастания. Основным компонентом эфирного масла котовника кошачьего, произрастающего в Северо-Кавказском регионе, является непеталактон, в Московской области – кариофиллен, в

Белгородской области – гераниаль. Эфирное масло, полученное из сырья, произрастающего в Северо-Кавказском регионе, имеет наибольшее количество компонентов в эфирном масле. Непеталактон отсутствует в сырье, произрастающем в Белгородской области.

ГЛАВА 6. ПОЛУЧЕНИЕ СУХИХ ОЧИЩЕННЫХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ КОТОВНИКА КРУПНОЦВЕТКОВОГО И КОТОВНИКА КОШАЧЬЕГО И УСТАНОВЛЕНИЕ ИХ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА

6.1 Химический состав

Было установлено, что в бутанольной фракций двух видов котовника содержится 1,5,9-эпидезоксилогановая кислота. Однако в котовнике крупноцветковом она находится в минимальном количестве, в то время как в котовнике кошачьем ее много. По данным ЯМР в котовнике крупноцветковом преобладает розмариновая кислота, в котовнике кошачьем ее чрезвычайно мало. В котовнике кошачьем, обнаружено вещество строение, которого близко к кофеилтартроновой кислоте. По данным ВЭЖХ в котовнике крупноцветковом обнаружены салициловая кислота, п-кумаровая, хлорогеновая, кофейная. В котовнике кошачьем п-кумаровая и розмариновая кислоты (меньше 1 %). Также были обнаружены флавоны минимальное количество (апигенин, лютеолин)

Также в экстрактах котовника кошачьего и котовника крупноцветкового обнаружены иридоидные гликозиды, принадлежащие к подгруппе логанина (1,5,9 эпидезоксилогановая кислота).

Таблица 15. Химический состав полученных экстрактов

Сухой очищенный экстракт из котовника кошачьего	Сухой очищенный экстракт из котовника крупноцветкового
1,5,9 эпидезоксилогановая кислота преобладает	1,5,9 эпидезоксилогановая кислота мало
Розмариновая кислота	Розмариновая кислота преобладает
Вещество не установленного строения, принадлежащее близко к строению кофеилтартроновой кислоте	Апигенин
Цинарозид минорные количества	Лютеолин
Хлорогеновая кислота	Лютеолин 7-гликозид
Апигенин минорные количества	Салициловая кислота
Вещество не установленного строения относящее к флавонам	Хлорогеновая кислота
П-кумаровая кислота	Кофейная кислота
Лютеолин	П-кумаровая кислота

Рутин	Цинарозид
	Рутин
	Кверцетин

6.2 Разработка методики количественного определения розмариновой кислоты в сухом очищенном экстракте котовника кошачьего методом ВЭЖХ

Приготовление раствора ортофосфорной кислоты для подвижной фазы. 5,0 мл ортофосфорной кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 1000 мл, затем доводят объем раствора водой до метки и перемешивают, которую используют для приготовления подвижной фазы смеси ортофосфорной кислоты – ацетонитрил (для хроматографии) в соотношении (70:30).

Навеску 0,0500 г (точная навеска) растертого порошка сухого очищенного экстракта котовника кошачьего помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл спирта этилового 70%, растворяют при комнатной температуре, доводят объем тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 10 мл помещают 2,0 мл раствора А, растворяют в подвижной фазе, доводят раствор до метки тем же растворителем, перемешивают и фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (раствор Б).

Приготовление стандартного раствора розмариновой кислоты. Навеску 0,0050 г розмариновой кислоты, помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, растворяют в спирте этиловом 70%, затем доводят объем тем же растворителем до метки и перемешивают (раствор А). 1,0 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в подвижной фазе, доводят объем тем же растворителем до метки и перемешивают. Раствор фильтруют через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм (раствор Б).

По 20 мкл раствора Б экстракта очищенного сухого котовника кошачьего, стандартного раствора Б розмариновой кислоты вводят в хроматограф с помощью

инжектора с дозирующей петлей и последовательно хроматографируют, получают не менее трех хроматограмм каждого из растворов.

Время регистрации хроматограммы должно не менее чем в два раза превышать время удерживания пика основного компонента на хроматограмме стандартного раствора розмариновой кислоты.

Для пригодности хроматографической системы необходимо выполнять следующие условия:

- При проведении пяти повторных введений стандартного раствора розмариновой кислоты стандартное относительное отклонение площадей пика розмариновой кислоты не должно быть больше 5,0 %;

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанная по пику розмариновой кислоты на хроматограмме стандартного раствора, не менее 3000 теоретических тарелок (ГФ XIII, ОФС.1.2.1.2.0001.15 «Хроматография»);

- фактор асимметрии пика розмариновой кислоты не более 2,0;

С целью достижения выполнения условий хроматографической системы, возможна корректировка соотношения компонентов подвижной фазы.

Количественное содержание розмариновой кислоты в экстракте (X %), вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \cdot a_0 \cdot 50 \cdot 1 \cdot 10 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot 50 \cdot 25 \cdot 2 \cdot 100 \cdot (100 - w)} = \frac{S \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot 5 \cdot (100 - w)},$$

где: S – среднее значение площади пика розмариновой кислоты на хроматограммах испытуемого раствора;

S₀ – среднее значение площади пика розмариновой кислоты на хроматограммах стандартного раствора;

a₀ – масса навески стандартного образца розмариновой кислоты, в г;

a – масса навески сухого экстракта, г;

P – содержание основного вещества в стандартном образце розмариновой кислоты, %.

w – потери в массе при высушивании сухого экстракта, %

По данной методике определили содержание розмариновой кислоты в экстракте сухом котовника кошачьего.

Таблица 16. Результаты ВЭЖХ-анализа РСО розмариновой кислоты

№ инъекции	S_0	$S_{\text{ср.}}$	a , Г	P , %
1	224633	224376	0,0042	96
2	224347			
3	224149			

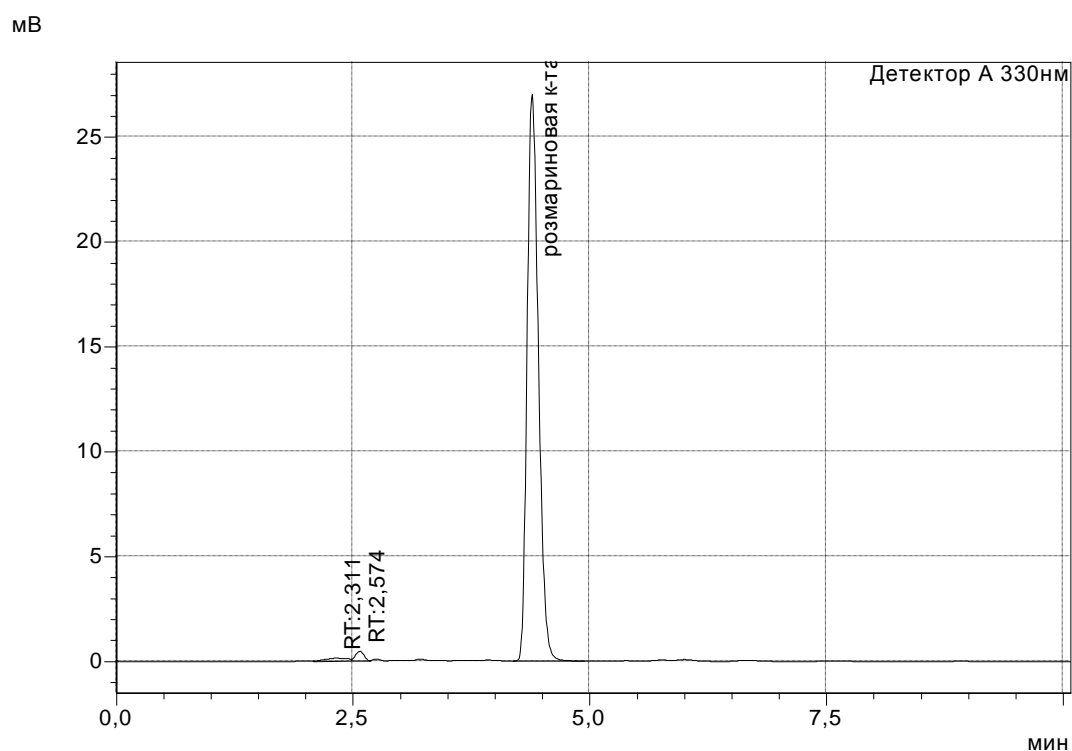


Рисунок 39. Хроматограммы РСО розмариновой кислоты

Таблица 17. Результаты ВЭЖХ-анализа экстракта сухого котовника кошачьего.

№ инъекции	S_x	$S_{\text{ср.}}$	a , Г	w , %	$X_{\text{ср.}}$, %
1	48207	48553	0,0477	4,4	0,38
2	48899				

мВ

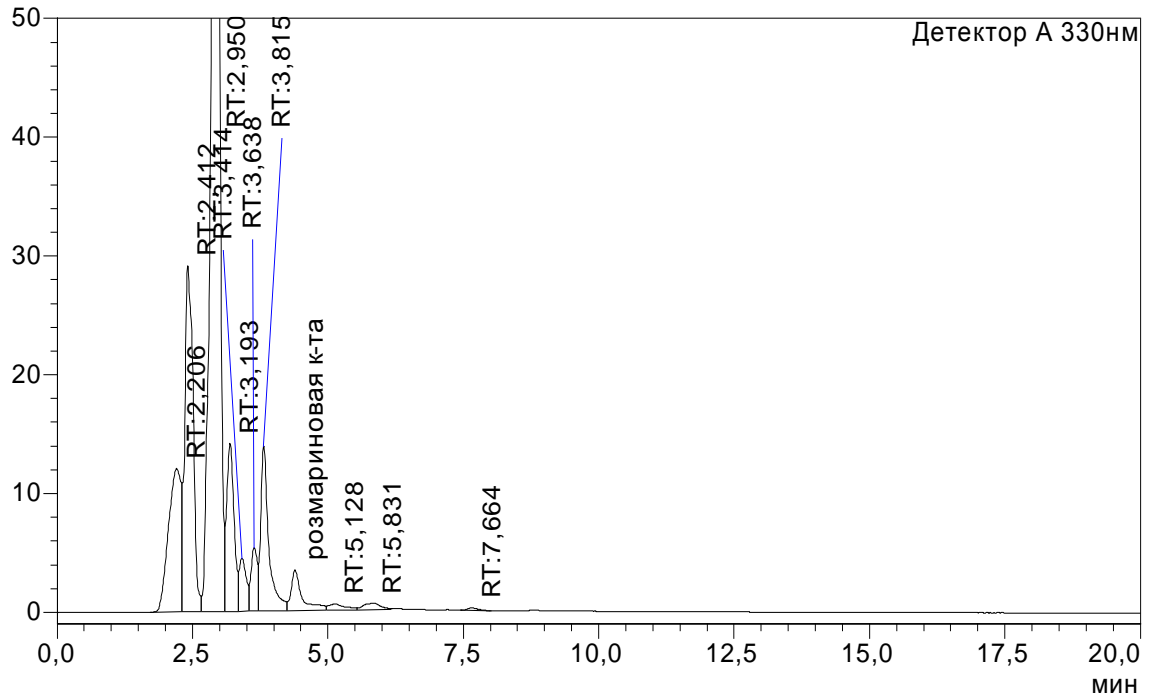
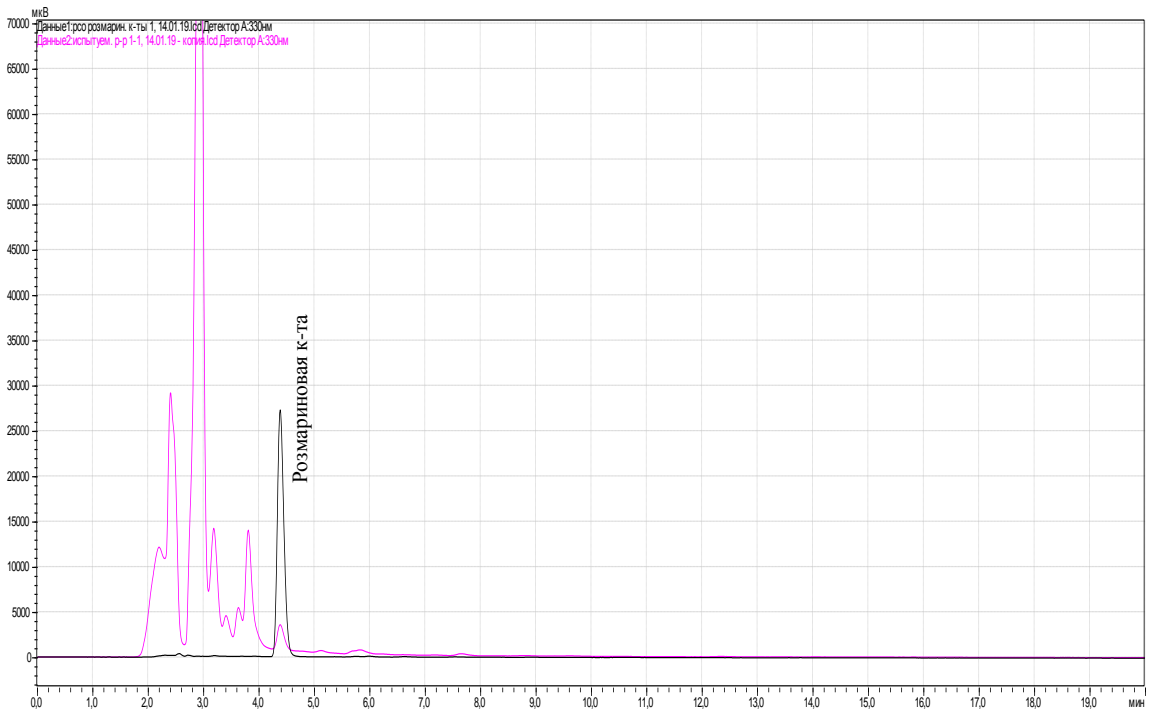


Рисунок 40 Хроматограмма экстракта котовника кошачьего

Рисунок 41 Хроматограмма экстракта котовника кошачьего и РСО розмариновой
КИСЛОТЫ

6.3. Определение биологической активности полученных экстрактов

В результате проведенных скрининговых исследований в условиях опытов *in vitro* на основе тирозингидроксилазы была выявлена дофаминергическая активность у котовника крупноцветкового экстракта сухого и котовника кошачьего экстракта сухого. При однократном введении экстрактов животным не наблюдалось изменения внешнего вида, поведенческих реакций мышей, также их гибели. Экстракты являются малотоксичными веществами в соответствии с ГОСТ 12.1.007-76. В дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг данные экстракты оказывают достоверно выраженное седативное действие, снижают нервно-эмоциональное напряжение. Седативное действие проявляется в улучшении засыпания и увеличении продолжительности сна (Приложение 14)

В результате проведенных скрининговых исследований в условиях *in vitro* на основе индуцибельной NO-синтазы была выявлена противовоспалительная активность экстрактов котовника кошачьего и котовника крупноцветкового (Приложение 15)

Выводы по главе 6. Установлен химический состав экстрактов котовника кошачьего и котовника крупноцветкового. В экстрактах присутствуют фенилпропаноиды, флавоноиды и иридоидные гликозиды группы логана.

Для экстрактов разработана методика количественного определения фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту и определена биологическая активность полученных экстрактов.

ГЛАВА 7. РАЗРАБОТКА СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ ЭКСТРАКТА ИЗ НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ ЗМЕЕГОЛОВНИКА МОЛДАВСКОГО И ЕГО СТАНДАРТИЗАЦИЯ.

Технология получения сухого экстракта «Розматин» заключается в том, что воздушно-сухое сырье (трава) змееголовника молдавского, заготовленного в ФГБНУ ВИЛАР, трижды экстрагируют 50 % водным этиловым спиртом в соотношении (сырье – экстрагент, 1:10). Водно-спиртовые извлечения концентрируют до водных кубовых концентратов, которые обрабатывают хлороформом. Органическую фазу отделяют, а остатки органического растворителя из водной фазы удаляют в вакууме. Хлороформные экстракты объединяют, упаривают и выводят из технологического процесса, а водный кубовый остаток разбавляют спиртом этиловым 96% в соотношении 1:10 для дальнейшей очистки. В результате чего выпадает светло-бежевый осадок, который отстаивают, затем надосадочный водно-спиртовый раствор фильтруют декантацией через фильтр Шотта № 3. Осадок промывают спиртом, затем высушивают на воздухе и передают на производство другой субстанции.

Надосадочный водно-спиртовый раствор из предыдущей стадии упаривают, затем остаток растворяют в 600 мл дистиллированной воды, в водный раствор добавляют катионит до рН раствора равного 3. Его фильтруют через фильтр ПОР 40 или ПОР 100.

Полученный кислый маточный раствор экстрагируют н-бутанолом, насыщенным водой трижды. Бутанольную фазу промывают дважды дистиллированной водой в соотношении 1:1 и далее бутанол отгоняют в виде азеотропы с водой в вакууме при 60 – 70°C. Получают 18 г субстанции «Розматин» с содержанием полифенолов в пересчете на розмариновую кислоту не ниже 60,0%.

7.1. Идентификация фенольных соединений в сухом очищенном экстракте «Розматин»

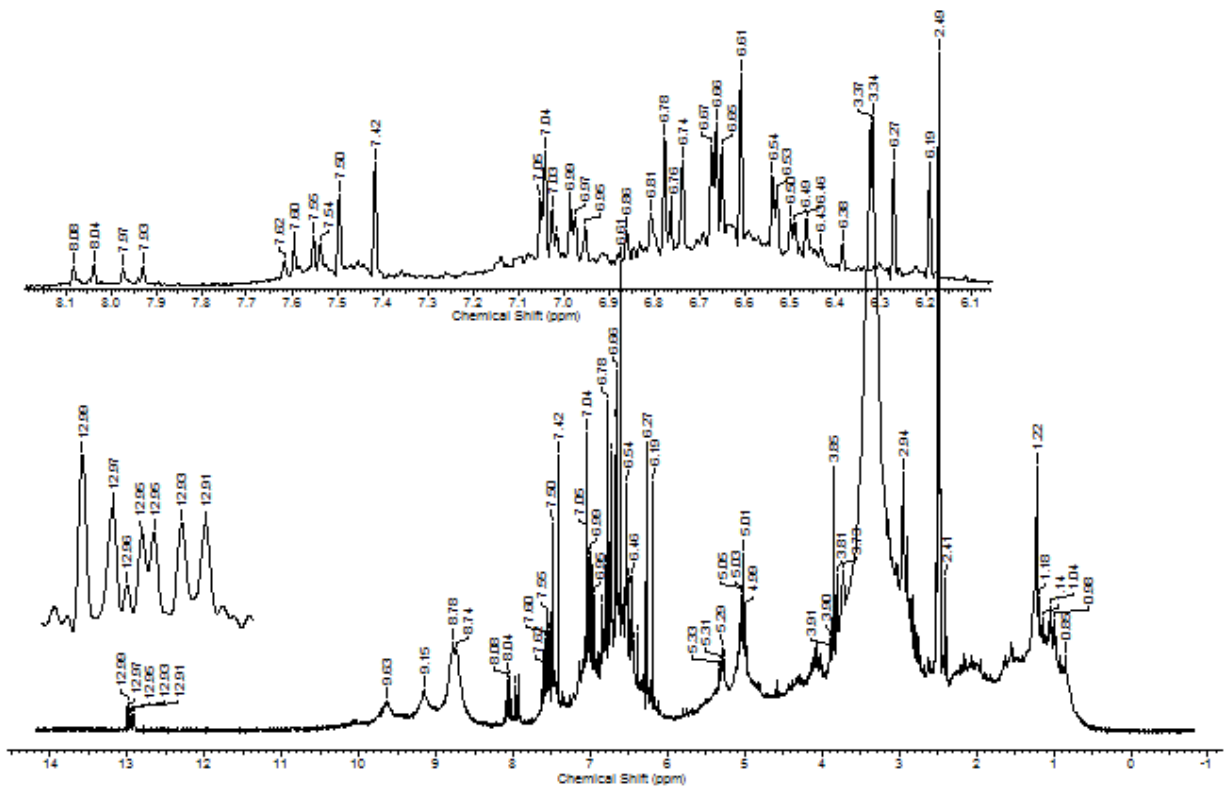


Рисунок 42. ^1H ЯМР спектр (G-200 МГц, DMSO). Змееголовник молдавский Северный Кавказ, надземная часть, фаза бутонизации. Субстанция «Розматин».

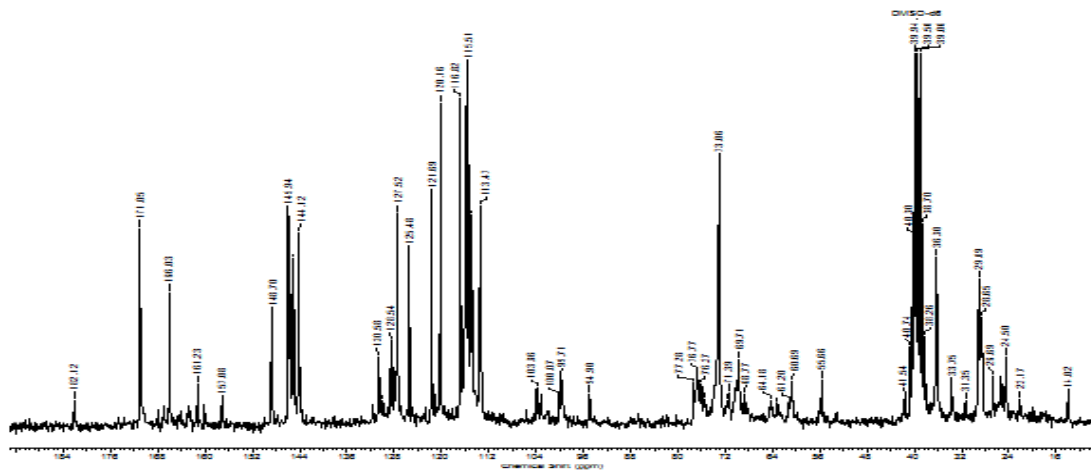


Рисунок 43. ^1H ЯМР спектр (G-200 МГц, DMSO). Змееголовник молдавский Северный Кавказ, надземная часть, фаза цветения. Субстанция «Розматин».

На рисунках 42 и 43 представлены ^1H ЯМР спектры Розматина, заготовленного в разные фазы вегетации.

ЯМР-спектры субстанции «Розматин», полученной из змееголовника молдавского, заготовленного в фазу бутонизации и в фазу массового цветения, близки между собой.

Наиболее интенсивные сигналы в спектре ЯМР относятся к розмариновой кислоте: два дублета (КССВ = 16,0 Гц) при 6,23 и 7,46 м. д. относятся к винильным протонам, мультиплет при 5,01 м.д. к остатку фенилмолочной кислоты (ФМК). Сигналы в виде уширенных синглетов при 8,74; 8,80 м. д., а также 9,16 и 9,64 м.д.- к протонам фенольных гидроксильных групп –остаткам (ФМК) и кофейной кислот соответственно.

Сигнал при 5.29 м.д. относится к ФМК фрагменту соединения – производного розмариновой кислоты.

Семь уширенных синглетов при 12,91; 12,93; 12,952; 12,958; 12,96; 12,97 и 12,99 м. д. относятся к сигналам Н-5 гидроксильных группа семи флавоноидов флавонового типа. Два дублета при 7,95 и 8,06 м. д. (КССВ =8,0 Гц) относятся к производным апигенина. Сигналы при 12,92; 8,06 и 3,85 м.д. относятся к тилианину. Сигнал при 12,99 м. д. относится к цинарозиду.

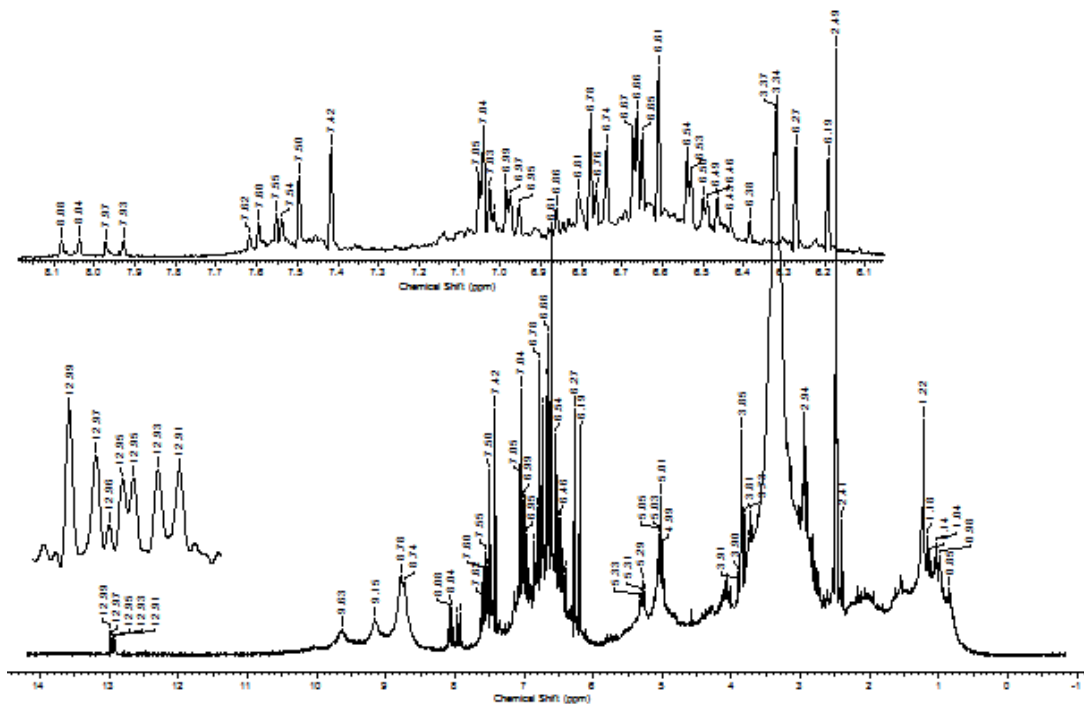


Рисунок 44. ^1H ЯМР спектр (G-200 МГц, DMSO). Змееголовник молдавский. Северный Кавказ, надземная часть, фаза цветения. Субстанция «Розматин».

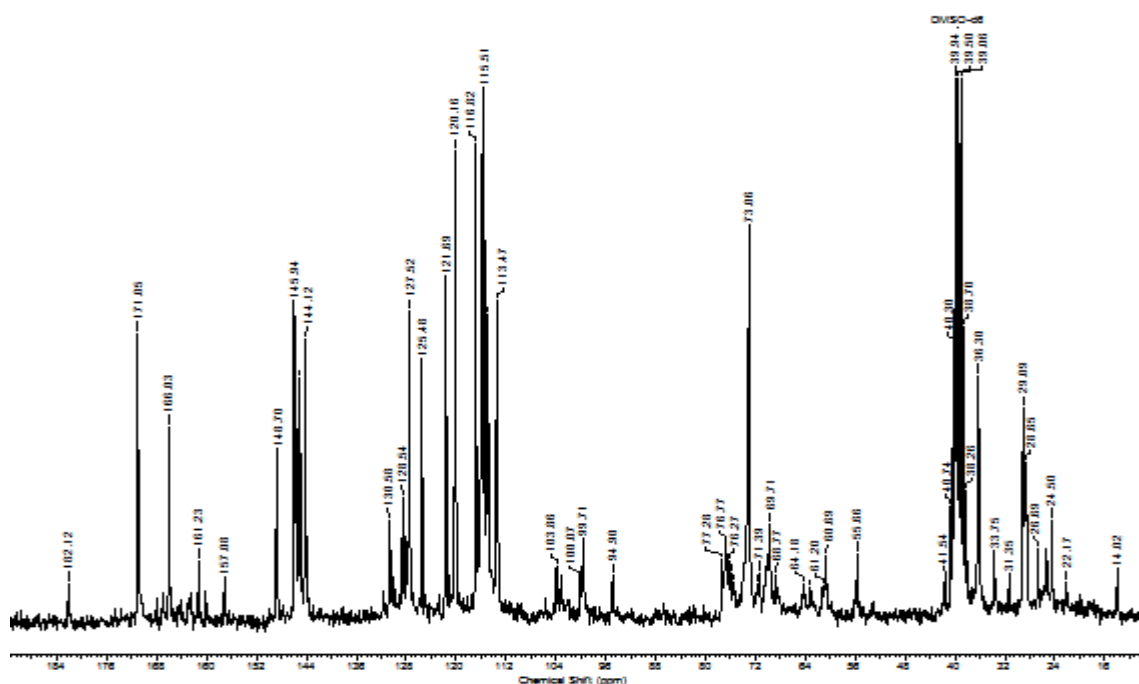


Рисунок 45. «Розматин» ^{13}C ЯМР – спектр 200 МГц в ДМСО из травы змееголовника молдавского, заготовленного на Средне-Волжском филиале ФГБНУ ВИЛАР в фазу цветения

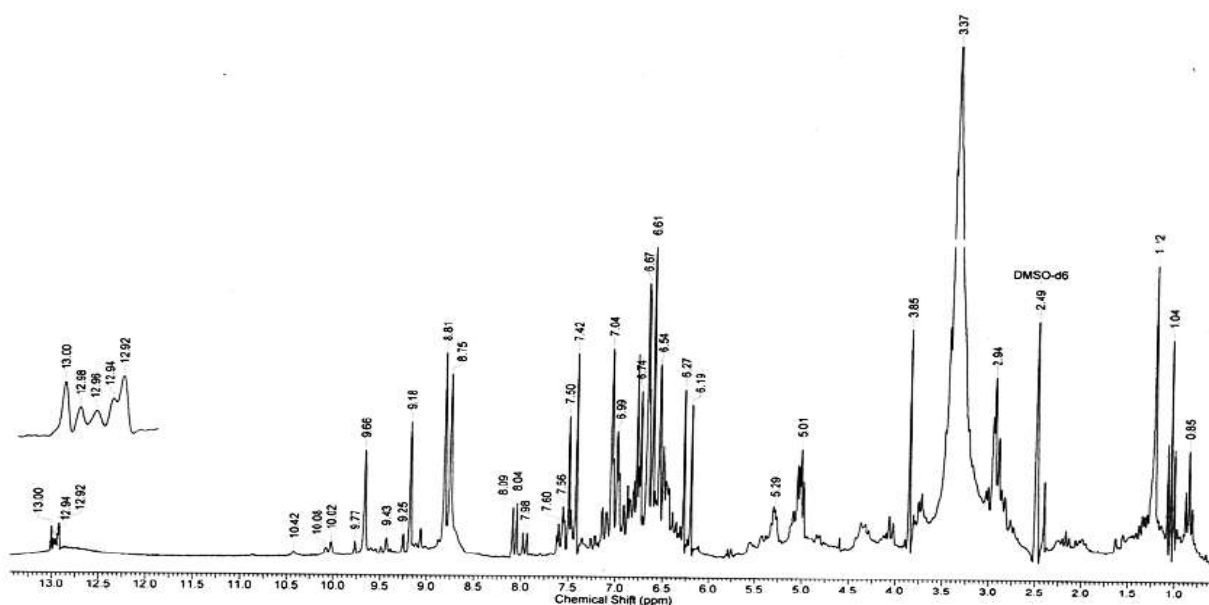


Рисунок 46. ^1H ЯМР спектр (G-200 МГц, DMSO). Змееголовник молдавский сорт «Нежность», надземная часть, фаза цветения. Субстанция «Розматин».

ЯМР-спектры субстанций «Розматин», полученной из змееголовника молдавского, заготовленного в фазу массового цветения, из разных мест произрастания близки между собой. В данной работе установление

относительного компонентного состава проводили на образце розматина, полученного из змееголовника молдавского травы сорта «Нежность».

При рассмотрении ЯМР спектра (рисунок 46) наиболее интенсивные сигналы в спектре ЯМР относятся к розмариновой кислоте: два дублета (КССВ = 16,0 Гц) при 6,23 и 7,46 м. д. относятся к винильным протонам, мультиплет при 5,01 м.д. к остатку фенилмолочной кислоты (ФМК). Сигналы в виде уширенных синглетов при 8,74; 8,80 м. д., а также 9,16 и 9,64 м.д.- к протонам фенольных гидроксильных групп –остаткам (ФМК) и кофейной кислот соответственно.

Сигнал при 5.29 м.д. относится к ФМК фрагменту соединения – производного розмариновой кислоты.

Семь уширенных синглетов при 12,91; 12,93; 12,952; 12,958; 12,96; 12,97 и 12,99 м. д. относятся к сигналам Н-5 гидроксильных группа семи флавоноидов флавонового типа. Два дублета при 7,95 и 8,06 м. д. (КССВ =8,0 Гц) относятся к производным апигенина. Сигналы при 12,92; 8,06 и 3,85 м.д. относятся к тилианину. Сигнал при 12,99 м. д. относится к лютеолин-7-О β-D-глюкурониду. В спектре ^{13}C розматина интенсивные сигналы относятся к розмариновой кислоте. Для флавоноидов флавонового типа характерным является наличие в их спектре ^{13}C сигнала при 182,12 м.д. (углерод карбонила, кольцо С).

Из сравнения с расчетными спектрами в спектре ^{13}C следует, что сигналы в две углеродные единицы при 128,03; 128,54 и 128,69 м.д. относятся к углеродам в положениях 2' и 5' кольца. В флавоноидах с одной гидроксильной группой в кольце В (тип апигенина). Кроме апигенина и тилианина в литературе описано два флавоноидов с одной гидроксильной в положении 4' (малонилтилианин, малонилапигенин). Все они содержат в 6 положении глюкозного фрагмента остаток малоновой кислоты (- $\text{COOCH}_2\text{COOH}$). Сигнал при 41,54 м.д. в согласии с расчетными спектрами относится к метиленовой группе малонильного остатка.

В двумерном спектре COSY Н,Н розмариновой кислоты относится кросс-пик (кп) 6,25/7,45 м.д., к тилианину и апигенину кп 8,0/7,2 м.д. и 7,9/6,9 м.д. соответственно. Кп в средней части спектра относятся к протонам гликозидного фрагмента флавоноидов.

На рисунках 47 и 48 представлены ^1H ЯМР-спектры индивидуального вещества тилианина (7- О- глюкозид акацетина) и лютеолин-7-О - β -D-глюкуронида, которые были получены из розматина.

На рисунках 50 и 51 представлены масс-спектры ионизации электрораспылением лютеолина-7-глюкуронида, регистрация отрицательных ионов и положительных которые были получены из розматина

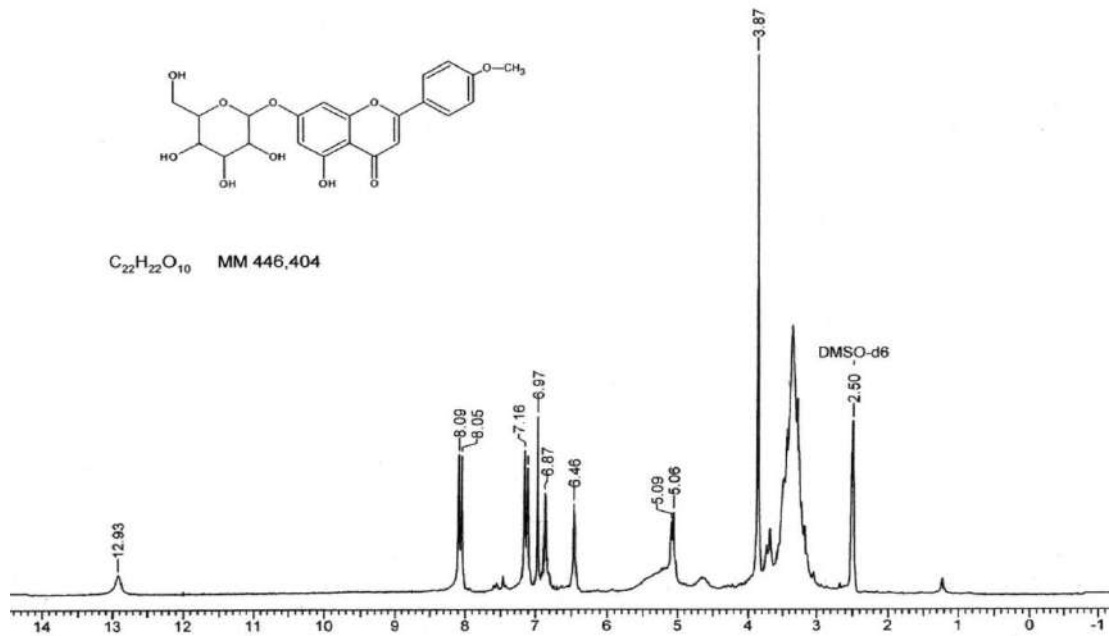


Рисунок 47. ^1H ЯМР спектр (200 МГц, DMSO- D_3). Тилианин (7- О-глюкозид акацетина) получен из «Розматина».

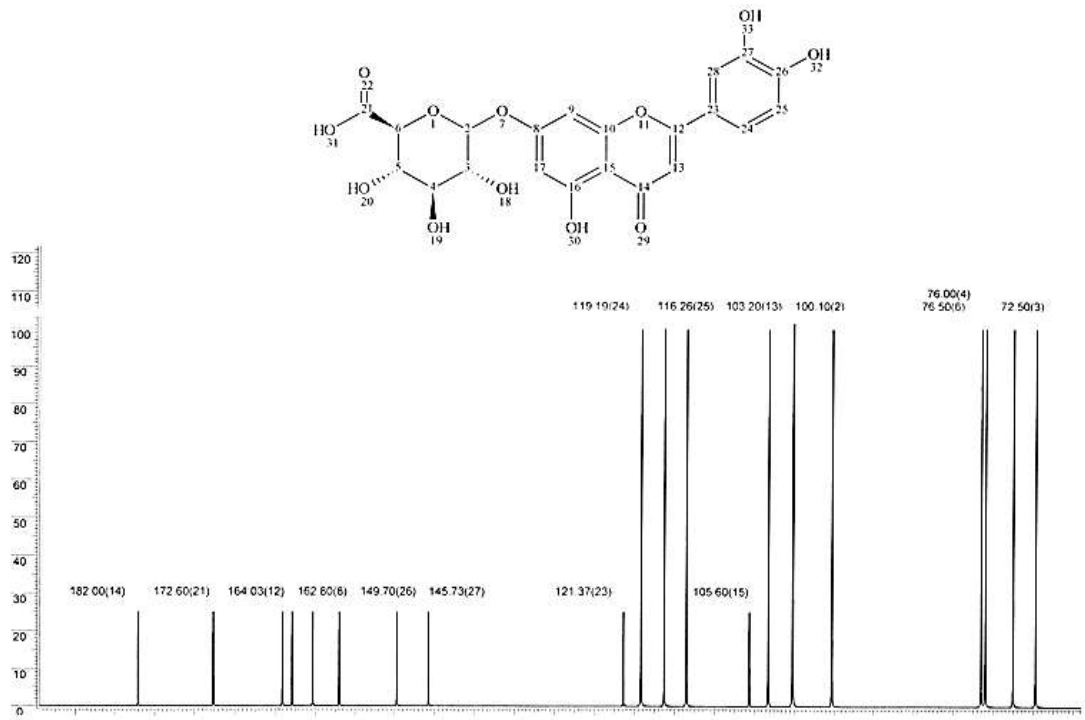


Рисунок 48. ^{13}C ЯМР спектр (200 МГц, DMSO-D_3). лютеолин-7-О β -D-глюкуронид. Получен из «Розматина».

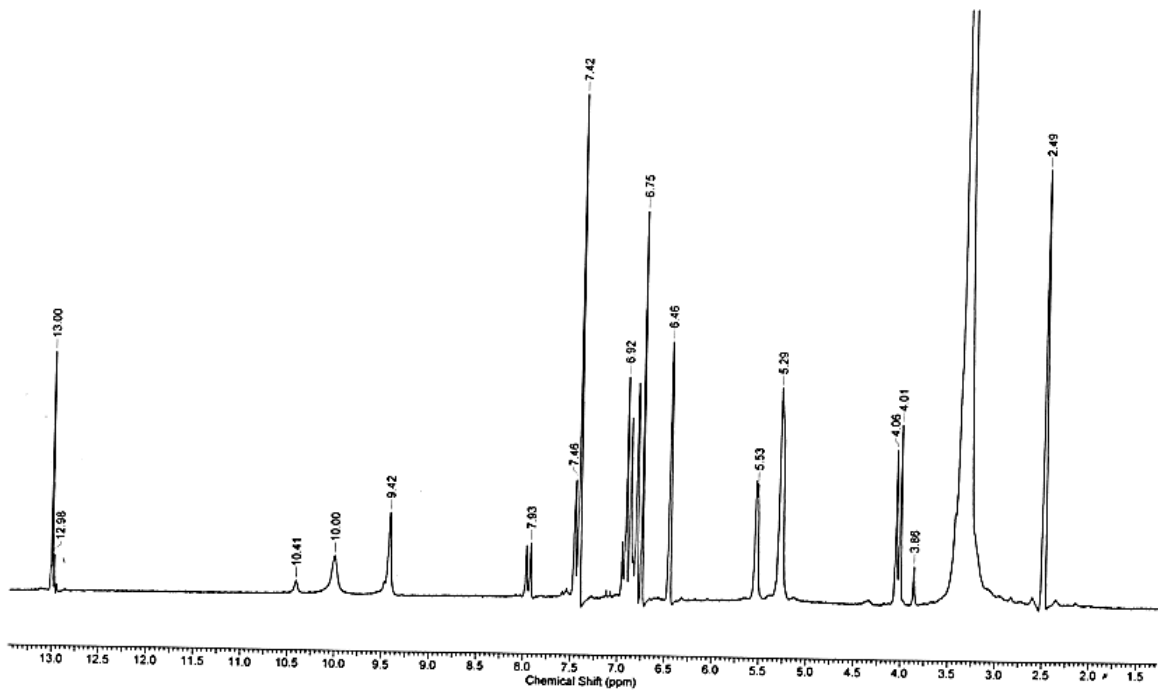


Рисунок 49. Спектр ^1H ЯМР(200 МГц, DMCO) лютеолин-7-О β -D-глюкуронид.

Получен из «Розматина».

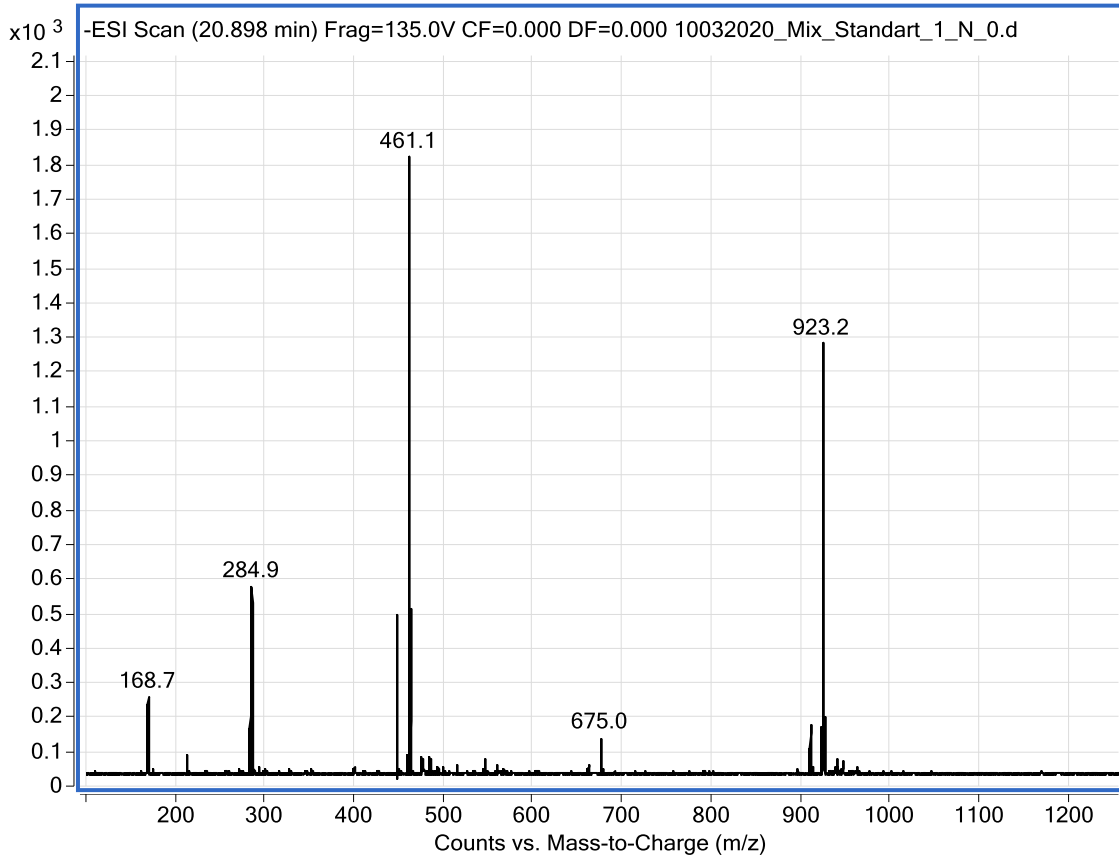


Рисунок 50. Масс-спектр ионизации электрораспылением лютеолина-7-глюкуронида, регистрация отрицательных ионов

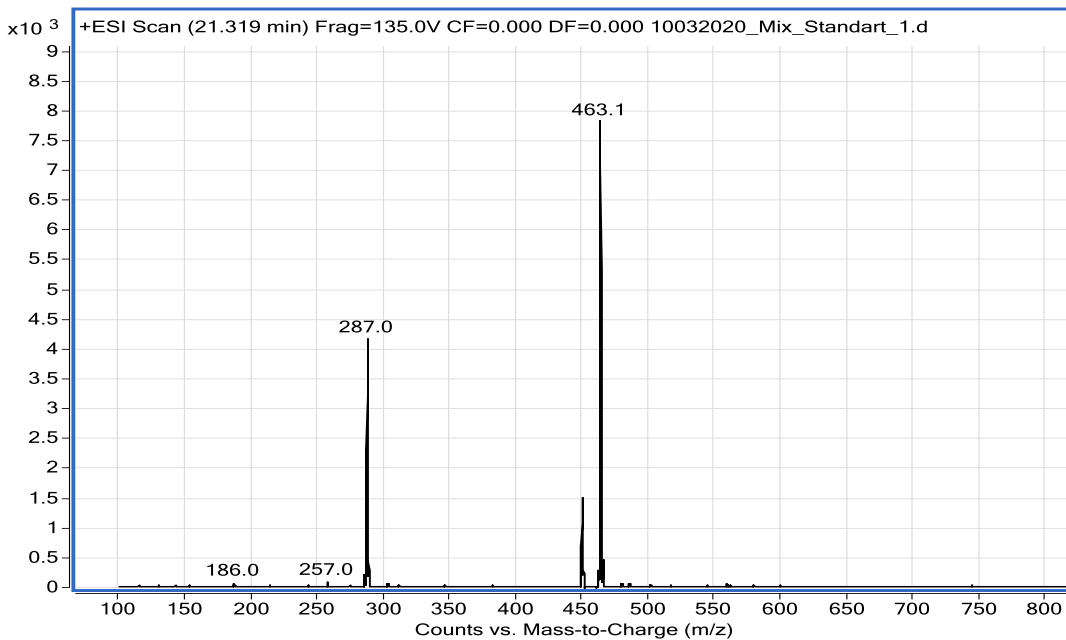


Рисунок 51. Масс-спектр ионизации электрораспылением лютеолина-7-глюкуронида, регистрация положительных ионов

Изучение компонентного состава субстанции «Розматина» проводили на образце, полученном из травы змееголовника молдавского сорта «Нежность».

В ^1H ЯМР спектре «Розматина» наиболее интенсивные сигналы относятся к розмариновой кислоте: два дублета ($\text{KCCB} = 16,0$ Гц) при 6,23 и 7,46 м.д. относятся к винильным протонам, мультиплет при 5,01 м.д. - к остатку фенилмолочной кислоты (ФМК). Сигналы в виде уширенных синглетов при 8,74; 8,80 м.д., а также 9,16 и 9,64 м.д. - к протонам фенольных гидроксильных групп – остаткам (ФМК) и кофейной кислот соответственно. Сигнал при 5,29 м.д. относится к ФМК фрагменту соединения – производного розмариновой кислоты.

Восемь уширенных синглетов при 12,92; 12,93; 12,94; 12,96; 12,97; 12,98; 12,99; 13,01 м. д. относятся к сигналам Н-5 гидроксильных групп восьми флавоноидов флавонового типа (рис. 15). Для флавоноидов флавонового типа также характерным является наличие в их спектре ^{13}C сигнала при 182,1 м.д. (С-4). Сигналы протонов Н-5 гидроксильных групп флавоноидов других типов (отличных от флавонового) в субстанции «Розматина» отсутствуют, что согласуется с литературными данными флавоноидного состава змееголовника молдавского [150].

Два вещества, дающие наиболее интенсивные сигналы при 12,92 и 13,01 м.д., выделены и идентифицированы по спектрам ЯМР как тилианин и лютеолин-7-О- β -D-глюкуронид. В спектре «Розматина» к тилианину относятся сигналы при 12,92; 8,06 и 3,86 м.д. Сигналы при 13,01 и 10,02 м.д. относятся к лютеолин-7-О- β -D-глюкурониду. Дублеты при 7,95 и 8,06 м.д. ($\text{KCCB} = 8,0$ Гц) относятся к протонам Н-2' и Н-5' производных апигенина и акацетина соответственно. Сигнал метоксильной группы акацетинов - трехпротонный синглет при 3,86 м.д. Для апигенинов сигнал при 10,4 м.д. относится к 4'-ОН протону (в апигенине 10,36 м.д.). В лютеолинах сигнал 4'-ОН протона проявляется при 10,0 м.д.

Согласно [109] в состав змееголовника молдавского входят два флавоноидных глюкозида малонилакацетина и малонилапигенина с остатком малоновой кислоты ($-\text{COOCH}_2\text{COOH}$) в положении 6". В спектре «Розматина» имеются сигналы при 41,45 и 41,70 м.д. (соотношение интенсивностей 2 к 3

соответственно), которые согласно расчетным спектрам ^{13}C ЯМР относятся к метиленовой группе малонильного остатка.

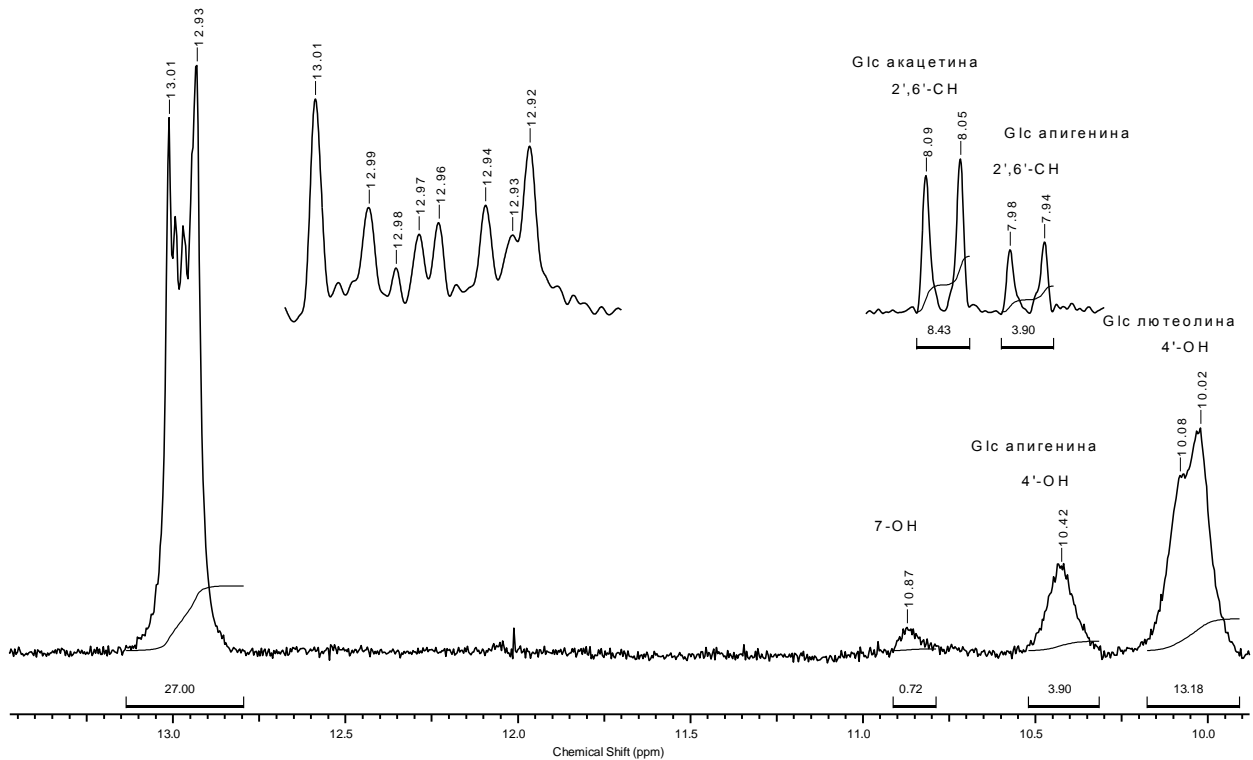


Рисунок 52. Фрагмент ^1H ЯМР-спектра (200 МГц, ДМСО- D_6) субстанции «Розматин» (сорт «Нежность»)

Небольшая интенсивность сигнала при 10,87 м.д., относящегося к 7-ОН группе флавоноидов, свидетельствует о том, что в «Розматине» доминируют глюкозиды.

Содержание флавоноидов (флавонов) определялось методом внутреннего стандарта. Измерялись площади 5-ОН протонов «Розматина» (область 12,9 – 13,1 м.д.) и сигнала 5-ОН протона флаванолола фелламурина (Мм 518,5 г/моль; синглет 11,84 м.д.)

Результат - 27% в пересчете на лютеолин-7-О- β -D-глюкуронид (М.м. 462 г/моль), содержание которого наибольшее среди флавоноидов.

Приведенное в спектре значение интеграла 5-ОН протонов установлено равным содержанию флавоноидов в пересчете на лютеолин-7-О- β -D-глюкуронид - 27 (одно значение интеграла устанавливается произвольно). Значения интегралов гликозидов апигенина и лютеолина приведенные в спектре равны содержанию в «Розматине» соответствующих классов флавоноидов, а также

флавоноидов с 7-ОН группой в перечете на лютеолин-7-О- β -D-глюкуронид. На рисунке 52 приведены также сигналы СН-2',6' протонов гликозидов апигенина и акацетина (дублеты при 7,95 и 8,06 м.д. (КССВ = 8,0 Гц) соответственно. Значение интеграла для гликозидов апигенина установлен таким же, как и для 4'-ОН протона (3,90). Таким путем установлено содержание гликозидов акацетина, не содержащих ОН группы в кольце В флавоноидов.

В таблице 18 представлены результаты определения компонентного состава экстракта змееголовника молдавского, сорт «Нежность», фаза цветения методом ВЭЖХ-УФ-МС. Установлено, что экстракт был представлен преимущественно 14 полифенольными соединениями, проявляющимися на УФ-хроматограмме при длине волны 340 нм, 7 из них присутствовали на УФ-хроматограмме при длине волны 290 нм (рисунок 53)

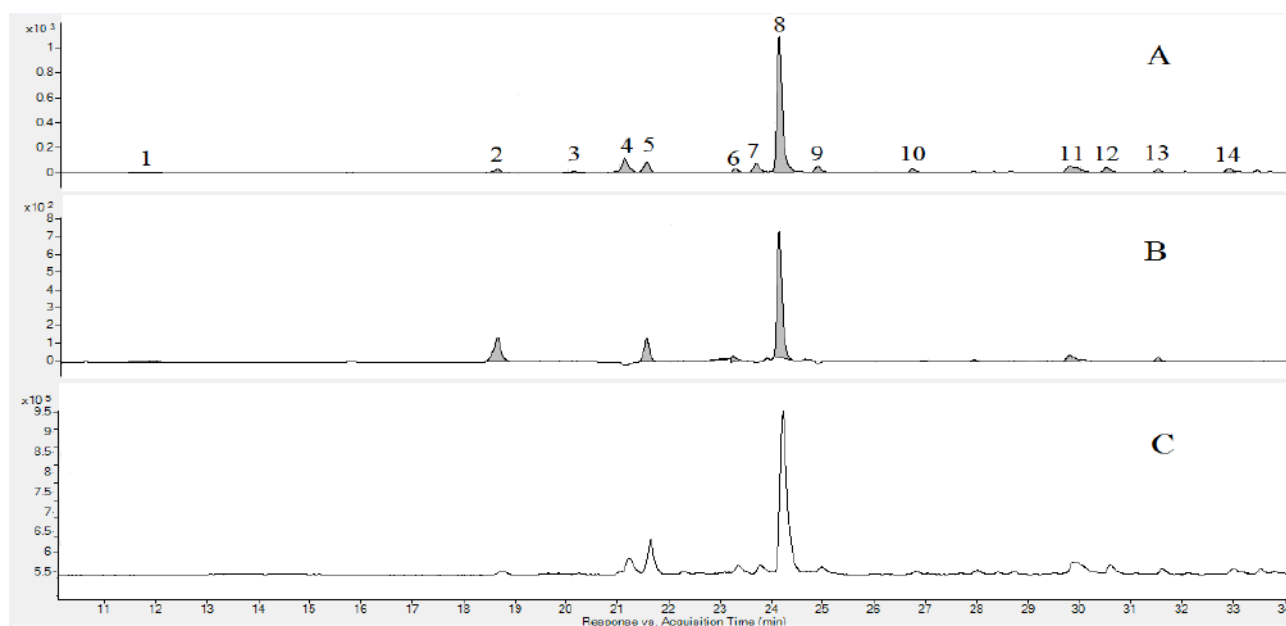
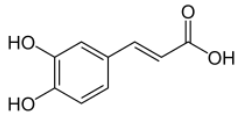
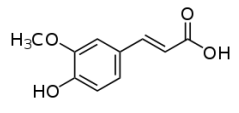
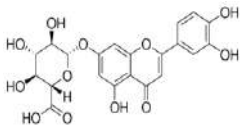
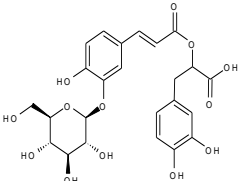
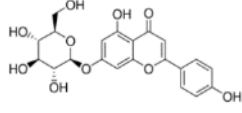
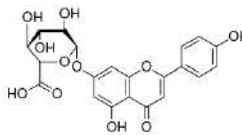
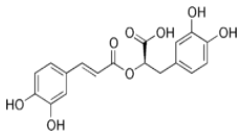
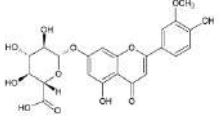
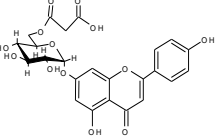
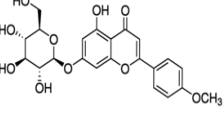
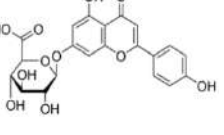
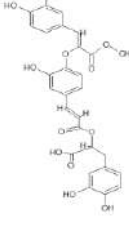
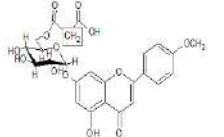


Рисунок 53. УФ-хроматограмма при длине волны 340 нм (А), УФ-хроматограмма при длине волны 290 нм (В) и хроматограмма по полному ионному току образца (регистрация отрицательных ионов) (С).

Таблица 18. Компонентный состав экстракта змеголовника молдавского, сорт «Нежность», фаза цветения.

№ №	Название	Время выхода, мин	Структурная формула	m/z, регистрация положительных ионов	m/z, регистрация отрицательных ионов	Молярная масса, г/моль	Содержание, %
1	Кофейная кислота	11,75		181, 163	179, 135	180	1,1
2	Неидентифицированное соединение	18,51	-	303, 147	581, 255, 163	582	1,9
3	Феруловая кислота	20,00		195, 177	193	194	0,8
4	Лютеолин-7-глюкуронид	20,99		463, 287	923, 461, 285	462	7,7
5	Розмариновая кислота -3-O-β-D- глюкозид	21,42		523, 540, 545, 561	1043, 521	522	10,7
6	Апигенин-7-глюкозид	23,11		433, 271	431, 269	432	1,4
7	Апигенин-7-глюкуронид	23,52		447, 271	891, 445, 269	446	4,3

8	Розмариновая кислота	23,96		743, 383, 163	719, 359	360	56,6
9	Хризоеариол-7- глюкуронид	24,71		477, 301	951, 445, 299	476	2,5
10	Апигенин-7-(6''-O-β-D- малонил) глюкозид	26,54		519, 271	1035, 517, 269	518	1,4
11	Акацетин-7-О-глюкозид (тилианин)	29,61		741, 521, 323, 285	717, 519, 283	446	5,7
12	Акацетин-7-О- глюкуронид	30,31		461, 285	919, 459, 283	460	2,2
13	Шизотенуин F	31,32		575, 355	551, 359	552	1,5
14	Акацетин-7-О-(6''-O-β- D-малонил) глюкозид	32,73		533, 285	1063, 531, 283	532	2,2

7.2. Разработка методики количественного определения суммы фенольных соединений в «Розматине». Валидация методики

При разработке методики количественного определения суммы фенольных соединений был изучен УФ-спектр «Розматина». Согласно полученным данным в диапазоне длин волн от 250 до 400 нм наблюдается два максимума поглощения при 327 ± 2 и 289 ± 2 нм. Аналогичный максимум поглощения при 327 ± 2 является характерным для стандартного образца (СО) розмариновой кислоты (рисунок 54). Полученный результат позволяет проводить количественное определение суммы фенольных соединений в субстанции «Розматин» в пересчете на розмариновую кислоту.

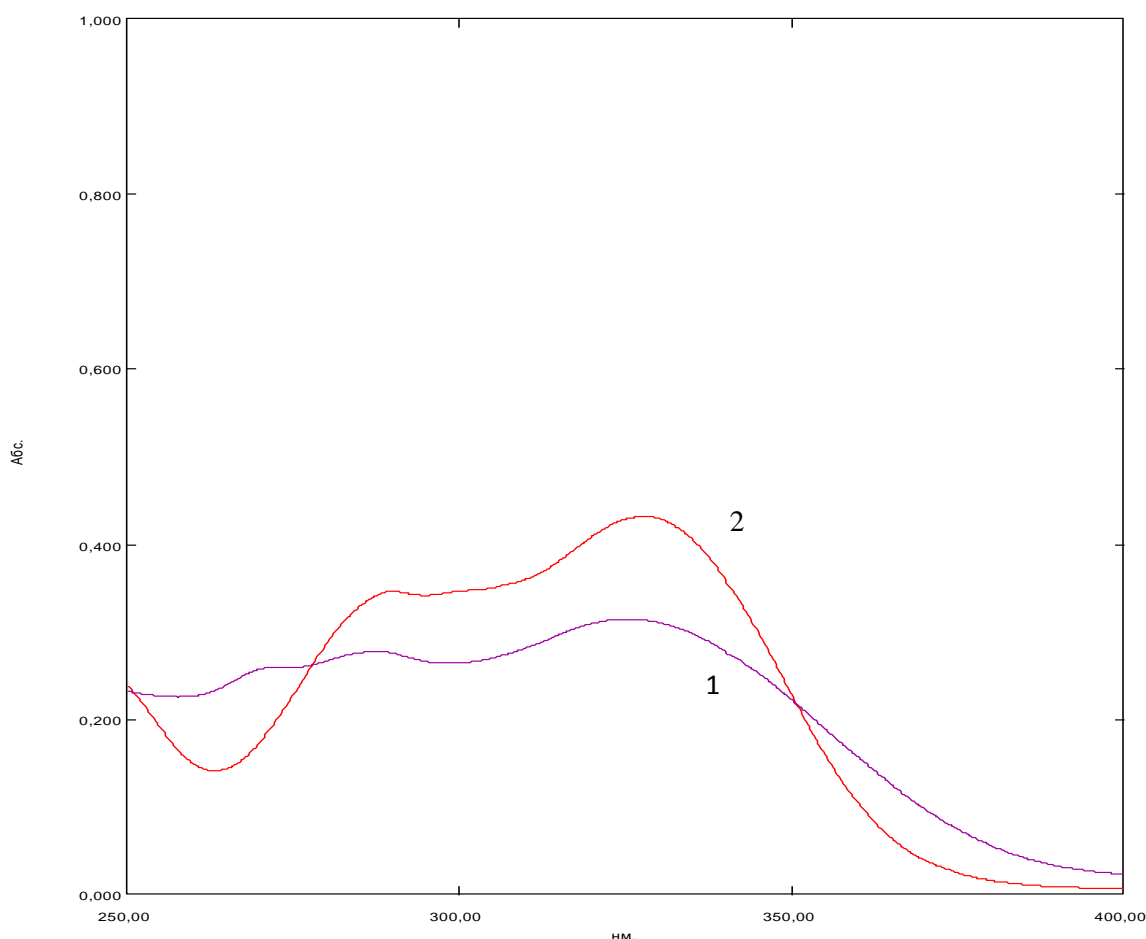


Рисунок 54. УФ-спектры, субстанции «Розматин» (1), СО розмариновой кислоты (2)

В ходе исследования подобрана оптимальная концентрация «Розматина» для съемки спектров и предложена методика определения суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту.

Методика.

Растертого порошка субстанции «Розматин» около 0,015 г (точная навеска) помещают в мерную колбу вместимостью 50 мл, прибавляют 20 мл 50% спирта этилового и растворяют при комнатной температуре, доводят до метки тем же спиртом и перемешивают (раствор А).

1 мл раствора А помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и доводят раствор до метки 50% спиртом (раствор Б). Оптическую плотность (раствора Б) измеряют на спектрофотометре в кювете с толщиной слоя 10 мм при длине волны 327 ± 3 нм. В качестве раствора сравнения используют спирт этиловый 50 %.

Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца (СО) розмариновой кислоты.

Содержание суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту (X%) вычисляют по формуле:

$$X\% = \frac{A \cdot 25 \cdot 50 \cdot a_0 \cdot 2 \cdot 100 \cdot 100}{a \cdot 1 \cdot (100 - W) \cdot A_0 \cdot 100 \cdot 25} = \frac{A \cdot a_0 \cdot 10000}{A_0 \cdot a \cdot (100 - W)}$$

где:

A – оптическая плотность испытуемого раствора;

A₀ – оптическая плотность СО розмариновой кислоты;

a – масса навески субстанции «Розматин», г;

a₀ – масса навески СО розмариновой кислоты, г;

W – потеря в массе при высушивании субстанции «Розматин», %.

Валидация проведена по следующим показателям: специфичность, линейность, правильность, внутрилабораторная прецизионность: сходимость и воспроизводимость.

Специфичность методики характеризовали совпадением максимумов поглощения субстанции «Розматин» и СО розмариновой кислоты при длине волны 327 ± 2 нм. Определение линейности СО розмариновой кислоты проводилось ранее при разработке методики количественного определения травы змееголовника молдавского.

Правильности методики проводилась на трех уровнях концентрации, соответствующих 80, 100, 120 % от номинального содержания в растворах. (таблица 19)

Таблица 19 - Результаты исследования контроля правильности методики

№ п/п	Найдено, мг	Добавлено СО, мг	Ожидаемое значение, мг	Полученное значение, мг	Абсолютная ошибка, мг	Выход, %
1.1	0,1961	0,0480	0,2441	0,2440	0,0001	99,9
2.1	0,1961	0,0960	0,2921	0,2964	-0,0043	101,5
3.1	0,1961	0,1440	0,3401	0,3439	-0,0038	101,1
1.2	0,2064	0,0480	0,2544	0,2578	-0,0034	101,1
2.2	0,2064	0,0960	0,3024	0,3020	0,0004	99,8
3.2	0,2064	0,1440	0,3504	0,3523	-0,0019	100,4
1.3	0,1989	0,0480	0,2469	0,2467	0,0002	99,9
2.3	0,1989	0,0960	0,2949	0,2954	-0,0005	100,2
3.3	0,1989	0,1440	0,3429	0,3374	0,0055	98,3
Среднее значение выхода, %				100,2		

В разработанной методике процент восстановления (выход) находится в пределах 98,3 % до 101,5 % и имеет среднее значение 100,2 %, что соответствует требованиям критерия приемлемости.

Для установления сходимости провели шесть параллельных определений на основании результатов, которых вычислили величину стандартного отклонения ($S=0,377$), относительной вероятной погрешности отдельного измерения ($\pm 0,528\%$) и коэффициента вариации. Значение коэффициента вариации 0,573 % (критерий приемлемости: не более 5%), что свидетельствует о прецизионности методики по сходимости.

Внутрилабораторную воспроизводимость определяли два аналитика на шести повторности образца субстанции «Розматин», приготовленных независимо друг от друга в течение двух дней

Полученные значения коэффициента вариации не превышают 2 %, различия между результатами сотрудников статистически незначимы ($F_{\text{факт.}} < F_{\text{табл.}}$), что позволяет считать внутрилабораторную прецизионность результатов приемлемой.

По разработанной методике определено содержание фенольных соединений 5 опытных серий «Розматина» (таблица 20)

Таблица 20. Содержание фенольных соединений в субстанции «Розматин 5 опытных серий «Розматина»

Опытные серии, сырье сорт «Нежность, цветения	фаза	Содержание фенольных соединений, в пересчете на розмариновую кислоту, %
1		68,68±0,36
2		88,02±0,46
3		60,67±0,32
4		74,92±0,39
5		74,66±0,39

На основании полученных данных следует определить ориентировочную норму содержания фенольных соединений в субстанции «Розматин» не менее 60,0 %

7. 3. Определение биологическая активности «Розматина»

Изучение биологического действия «Розматина» при курсовом введении в дозах 10 и 100 мг/кг на деятельность сердечно-сосудистой и нервной системы мышей имеет следующие результаты:

1. «Розматин» в дозе 10 мг/кг достоверно усиливает спонтанную двигательную активность мышей - в 1,72 раза по сравнению с группой контроля - через 2 часа после начала тестирования.

2. «Розматин» в дозах 10 и 100 мг/кг вызывает достоверное повышение систолического (на 13 % и 11 %, соответственно) и пульсового (на 36 % и 31 %, соответственно) артериального давления по сравнению с группой контроля, а также демонстрирует достоверный положительный хронотропный эффект - учащение сердечных сокращений на 24 % и 20 %, соответственно, по сравнению с контрольными животными.

3. «Розматин» в дозе 100 мг/кг оказывает достоверное фазовое действие на параметры сна, вызванного «корковым снотворным анализатором» хлоралгидратом: после фазы активирующего влияния на центральную нервную систему, характеризующегося увеличением времени засыпания (латентного периода сна) в 1,4 раза по сравнению с группой контроля, затем наблюдалось потенцирование коркового торможения, вызываемого хлоралгидратом, и увеличение общей продолжительности сна в 1,36 раза по сравнению с контрольными животными. Таким образом, исследуемый образец «Розматина» обладает активирующим, тонизирующим действием на сердечно-сосудистую и нервную системы (Приложение 8).

Проведенные экспериментальные исследования по изучению нейротропной активности экстракта «Розматин» показали, что данный экстракт вызывает

сокращение латентного периода сна, достоверно уменьшает продолжительность сна (Приложение 11)

«Розматин» в условиях модели «открытое поле» увеличивал двигательно-ориентировочную и исследовательскую активность животных, а также снижал уровень эмоциональности. В данном эксперименте у подопытных животных не выявлено неврологических нарушений, аномального поведения (Приложение 10).

Проведенные экспериментальные исследования по изучению нейротропной активности экстракта «Розматин» на модели приподнятый крестообразный лабиринт показали, что данный экстракт при однократном введении уменьшает нервно-эмоциональное напряжение животных (Приложение 9)

«Розматин» при трёхдневном введении мышам обладает достоверным противовоспалительным эффектом, подавляя развитие экссудативной фазы воспаления, вызванной 1% формалином (Приложение 12).

На экспериментальной модели язвы желудка крыс, вызванной введением этанола, выявлено достоверное дозозависимое гастропротективное действие змееголовника молдавского экстракта очищенного сухого «Розматин», превышающее гастропротективное действие препарата сравнения омепразола (Приложение 13)

Выводы по главе 7

В результате фитохимического изучения показано, что в состав «Розматина» входит розмариновая кислота (основной компонент) и семь флавоноидов относящихся к флавоновому типу из которых три это- тилианин, лютеолин-7-0-глюкозид, апигенин, а также 7-0-глюкозиды, вещества содержащие малонильный остаток, присоединенный в 6-положении к глюкозному остатку.

Разработана и проведена валидационная оценка «Розматина». По разработанной методике определено содержание фенольных соединений 5 опытных серий «Розматина». На основании полученных данных следует определить ориентировочную норму содержания фенольных соединений в субстанции «Розматин» не менее 60,0 %.

Установлена специфическая биологическая активность сухого экстракта «Розматина»: обладающего активирующим, тонизирующим действием на сердечно-сосудистую и нервную системы, а также противотревожным и седативным действием.

Общие выводы

Проведено фитохимическое изучение травы змееголовника молдавского, разработана методика количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту в траве.

Основные результаты экспериментального исследования представителей семейства *Lamiaceae*:

1. Проведено фитохимическое исследование сырья змееголовника молдавского, заготовленного на территории ФГБНУ ВИЛАР. Установлено, что в исследуемом сырье содержатся фенольные соединения (флавоноиды, фенилпропаноиды, дубильные вещества, фенолкарбоновые кислоты). Методом УФ-спектрофотометрии определено количественное содержание фенольных соединений в сырье змееголовника молдавского. Разработана и валидирована методика количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту. Разработана методика определения подлинности сырья с использованием ТСХ и аутентичного образца розмариновой кислоты, подобраны условия хроматографирования (система растворителей и способ детектирования веществ).

2. Изучена динамика накопления фенольных соединений в траве змееголовника молдавского. Установлена фаза заготовки сырья - цветения и определена ориентировочная норма содержания фенольных соединений в сырье – не менее 5,5 %. Из изученных образцов наибольшее содержание фенольных соединений отмечено у образцов сорта «Нежность», выращенных на опытном поле ВИЛАР.

3. Разработана технология получения субстанции из травы змееголовника молдавского, позволяющая максимально извлечь фенольные соединения.

Установлено, что в состав «Розматина» входят флавоноиды (флавонов) и фенилпропаноиды. Предложена методика количественного определения фенольных соединений в «Розматине» и проведена ее валидация. По разработанной методике определено содержание фенольных соединений 5 опытных серий «Розматина». Определена ориентировочная норма содержания фенольных соединений в субстанции «Розматин» не менее 60,0 %.

Для «Розматина» установлена специфическая биологическая активность. «Розматин» обладает активирующим, тонизирующим действием на сердечно-сосудистую и нервную системы, а также противовоспалительными, гастропротективными свойствами.

4. Физико-химическими методами исследования ЯМР (^1H и ^{13}C) и ВЭЖХ-МС-УФ установлен химический состав и количественное содержание веществ экстракта «Розматина». В состав «Розматина» входят розмариновая кислота (основной компонент) и флавоноиды, относящихся к флавонам, из которых это-тилианин, лютеолин-7-0-глюкозид, апигенин, а также 7-0-глюкозиды, вещества содержащие малонильный остаток, присоединенный в 6-положении к глюкозному остатку.

5. Установлены нормы качества травы змееголовника молдавского и экстракта сухого «Розматин» необходимые для включения в проект ФС «Трава змееголовника молдавского» и НД сухой экстракт «Розматин».

6. Определены морфолого-анатомические признаки различных частей травы котовника кошачьего и котовника крупноцветкового (лист, стебель, чашечка, венчик) необходимые для установления подлинности этих видов сырья.

7. В бутанольных извлечениях и в экстракте котовника кошачьего и котовника крупноцветкового содержатся иридоидные гликозиды, фенилпропаноиды и флавоноиды. Получена и идентифицирована 1,5,9 эпидезоксилогановая кислота из надземной части котовника кошачьего.

8. В экстракте котовника крупноцветкового преобладает розмариновая кислота, а в экстракте котовнике кошачьем преобладает иридоидный гликозид 1,5,9-эпидезоксилогановая кислота, а розмариновая кислота присутствуют в

минимальном количестве. Проведенные экспериментальные исследования по изучению нейротропной активности экстракта котовника кошачьего и котовника крупноцветкового показали, что они оказывают достоверно выраженное седативное и противотревожное действие.

Список использованной литературы

1. Абдуллаева, Н. С. Род *Dracoscephalum* L. (Lamiaceae) во флоре Узбекистана / Н. С. Абдуллаева, О. К. Ходжиматов // Бюллетень Брянского отделения Русского ботанического общества. – 2016. - № 2 (8). – С. 3-8
2. Анищенко, И. Е. Нетрадиционные пряно-ароматические растения семейства Lamiaceae в Башкортостане / И. Е. Анищенко // Вестник ОГУ. -2009. - №6. – С. 35-38
3. Байрамукова, Ф. А. Потенциал лекарственных видов сем. Яснотковых Карачаево-Черкесской Республики / Ф. А. Байрамукова, А. С.Койчуева, В. А. Челомбитько // Матер. 53-й регион. Конф. по фарм., фармакологии и подготовке кадров. Пятигорск, 1998. -С. 5-8.
4. Бойко, В. П. Нейротропная активность змеголовника молдавского / В. П. Бойко, П. П. Омельницкий // Решение актуальных задач фармации на современном этапе: тез.докл.науч.конф. - 1994. - С. 280-281.
5. Боков, Д. О. Лекарственные растения семейства яснотковых (*Lamiaceae* Lindl.) в ботаническом саду Первого Московского Государственного Медицинского Университета имени И.М. Сеченова / Д. О. Боков, С. Л. Морохина, А. Н. Луферов // В сборнике: Лекарственное растениеводство: от опыта прошлого к современным технологиям. - 2013. - С. 29-34.
6. Буданцев, А. Л. Конспект трибы *Nepetae* (Lamiaceae), роды *Lophanthus*, *Dracoscephalum*, *Cedronella*, *Schizonepeta*, и *Agastache* / А. Л. Буданцев // Ботанический журнал. – 1993. - Т. 78. - № 2. - С. 106-111
7. Буданцев, А. Л. Химический состав и полезные свойства видов *P. Dracoscephalum* L Флоры СССР / А.Л. Буданцев, А. Л. Шаварда // Растительные ресурсы. - 1986. - Выпуск 4. - С.550-558.
8. Воскобойникова, И. В. Фито Ново-Сед – новое лекарственное средство растительного происхождения с анксиолитическими и седативными свойствами / И. В. Воскобойникова, В. К. Колхир, М. Ф. Минеева, Л. Б.

- Стрелкова // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2008. - № 1. - С. 38–45.
9. Государственная фармакопея РФ XIII издания. Федеральная электронная медицинская библиотека Министерства здравоохранения Российской Федерации. – Москва 2015. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://femb.ru/feml>
 10. Государственная фармакопея РФ XIV издания. Федеральная электронная медицинская библиотека Министерства здравоохранения Российской Федерации. – Москва 2018. [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <http://femb.ru/feml>
 11. Государственный реестр лекарственных средств. URL: <http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx>
 12. Данилова, Н. С. Интродукционные возможности видов рода *Dracoscephalum* L. в Центральной Якутии / Н. С. Данилова, П. А. Павлова // Вестник КрасГАУ. – 2012. - № 9. – С. 70-74
 13. Денисова, Г.Р. Жизненные формы рода *Dracoscephalum* L. горных систем Северной Азии / Г.Р. Денисова // Изв. АН Респ. Тадж. Отд. биол. и мед. наук. - 2008. - № 3(164). - С. 22–29.
 14. Денисова, Г.Р. Онтогенез и онтогенетическая структура ценопопуляций *Dracoscephalum heterophyllum* subsp. *ovalifolium* (Lamiaceae) на северной границе ареала в восточном Забайкалье / Г. Р. Денисова // Растительный мир Азиатской России. – 2013. - № 1(11). – С. 19–23.
 15. Евдокимова, Н. И. Иридоиды растений семейства яснотковых как фармакологически активные вещества / Н. И. Евдокимова, Т. П. Пулатова, Г. П. Исамухамедова // Орг. и экон. фармации, технол. и фармакол. некотор. лекарств. препаратов. Сб. науч. тр. Ташкент: Ташк. гос. мед. ин-т. - 1990. - С. 50–53.
 16. Егорова, П. С. К Интродукции *Dracoscephalum nutans* L. (змееголовника поникшего) в Якутском Ботаническом саду / П. С. Егорова // Вестник

- Алтайского государственного аграрного университета. - 2016. - № 1 (135). - С. 82-86.
17. Железняк, Т. Г. Влияние некоторых агрофитотехнических факторов на продуктивность змееголовника молдавского (*Dracoscephalum moldavica* L.) / Т. Г. Железняк, З. Н. Ворнику, Н. В. Баранова // Материалы Всероссийской научной конференции с международным участием. «Вклад агрофизики в решение фундаментальных задач сельскохозяйственной науки». 2020. - г. Санкт-Петербург, С. 118-124
18. Игнатовец, О. С. Идентификация фенольных соединений змееголовника молдавского (*Dracoscephalum moldavica* L.) / О. С. Игнатовец, О. Г. Совастей, Е. В. Феськова, В. Н. Леонтьев, В. В. Титок // Труды БГТУ. – 2020. - Серия 2. - №1. - С. 5- 10.
19. Кашенко, Н. И. Химический профиль и биологическая активность флавоноидов и фенилпропаноидов *Nepeta cataria* L. (Lamiaceae), интродуцированного в Восточной Сибири / Н. И. Кашенко, Д. Н. Оленников // Химия растительного сырья. - 2016. - №2. - С. 25–32.
20. Кирсанова, Н. В. Интродукционные возможности двух представителей рода *Dracoscephalum* L. в подзоне Южной тайги Западной Сибири. / Н. В. Кирсанова, Н. С. Зиннер, Т. Г. Харина // IV МНПК «Актуальные проблемы современной науки в 21 веке». – Махачкала. – 2014. - С. 15-17.
21. Кузнецова, Н.М. Нетрадиционные культуры с уникальными свойствами в Ленинградской области / Н. М. Кузнецова // Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. – 2015. – №39. - С. 35-39
22. Кузнецова, Н. М. Переработка видов котовника в Северо-Западном регионе России / Н. М. Кузнецова // Известия Санкт-Петербургского государственного аграрного университета. – 2016. - № 43. - С. 44-49.
23. Курамагомедов, М. К. *Nepeta* L. в природе Дагестана и в коллекции горного ботанического сада / М. К. Курамагомедов, З. А. Гусейнова // Сборник материалы Всероссийской научной конференции «Роль

- ботанических садов в изучении и сохранении генетических ресурсов природной и культурной флоры». – Махачкала. – 2013. – С.71-73.
24. Ламрини, М. Флавоноиды и терпеноиды цветков лаванды колосовой / М. Ламрини, В. А. Куркин, П. Г. Мизина, М. В. Беляева, Ю. И. Арутюнов, Л. А. Онучак // Химия растительного сырья. - 2008. - № 1. - С. 77–80.
25. Ламрини, М. Флавоноиды и эфирное масло цветков лаванды колосовой / М. Ламрини, В. А. Куркин, П. Г. Мизина, М. В. Беляева, Ю. И. Арутюнов, Л. А. Онучак // Фармация. - 2008. - № 1. - С. 16–19.
26. Макаров, В. Г. Экспериментальное и клиническое изучение влияния препарата иридол на центральную нервную систему / В. Г. Макаров, А. Е. Александрова, А. Н. Шиков, Л. В. Шилер, В. Е. Рыженков // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2006. - Т. 69. - №3. - С. 23–25.
27. Маммадова, З. А. Изучение ареалов распространения видов рода *Nepeta* L. в Азербайджане, их морфолого-биологические особенности и эфиромасличность / З. А. Маммадова // Hortus botanicus. – 2012. – Т.7. – С. 1-3.
28. Ожерельева А. С. Сравнительное изучение внешних признаков травы мелиссы лекарственной (*Melissa officinalis* L.), змееголовника молдавского (*Dracoscephalum moldavica* L.), котовника кошачьего (*Nepeta cataria* L.), котовника Фассена (*Nepeta faassenii* Bergmans ex Stern) и котовника крупноцветкового (*Nepeta grandiflora* Vieb) / А. С. Ожерельева, С. Л. Морохина // Сборник трудов четвертой научно-практической конференции аспирантов и молодых ученых «Молодые ученые и фармация XXI века». – Москва. – 2016. - С. 292-296
29. Палий, И. Н. К использованию *Nepeta cataria* var. *Citriodora* Beck в озеленении территорий / И. Н. Палий // Сборник научных трудов государственного Никитского ботанического сада. – Ялта. – 2014. - Том 136. – С. 113-122.

30. Палий, А. Е. Биологически активные вещества *Nepeta cataria* L. / А. Е. Палий и др. // Бюллетень государственного Никитского ботанического сада. – 2016 - №118. - С. 37-44
31. Пешкова, Г. А. Род *Dracoscephalum* L. – Змееголовник / Г. А. Пешкова // Флора Сибири: *Ryrolaceae–Lamiaceae*. Новосибирск. - 1997. - Т. 11. - С. 170–185.
32. Пивоваров, В. Ф. Овощи России. М.: Изд-во ГНУ ВНИИССОК. – 2006. – 384 с.
33. Попова, О. И. Змееголовник молдавский и иссоп лекарственный: современный взгляд на растения. / О. И. Попова, А. С. Никитина // Волгоград: Издательство ВолгГМУ. - 2014. – 224 с.
34. Разуваева, Я.Г. Стресс-протективное и антиоксидантное действие экстракта сухого *Schizonepeta multifida* (L.) Briq. / Я. Г. Разуваева, Д. В. Харжеев, А. А. Горопова, Д. Н. Оленников // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. - 2018. - № 21(7). Р. 5-10.
35. Реестр свидетельств о государственной регистрации (единая форма Таможенного союза, российская часть) – Режим доступа [<https://nevacert.ru/reestr/gos-reestr/ru-77-99-11-003-e-001339-04-19-366667>]
36. Серебряная, Ф. К. Эколого-ботанические и фитохимические исследования представителей семейства *Lamiaceae* в рамках проведения комплексного мониторинга перспективных ресурсных видов флоры Северного Кавказа /Ф. К. Серебряная // Флора и заповедное дело на Кавказе: история и современное состояние изученности: материалы Международной конференции (22–25 мая 2019 г. Пятигорск). – Пятигорск. - 2019. - С. 76–84.
37. Тараховский, Ю. С. Флавоноиды: биохимия, биофизика, медицина /Ю. С. Тараховский, Ю. А. Ким, Б. С. Абдрасилов // Пушино: Synchrobook, 2013. 310 с.

38. Тернинко, И. И. Идентификация гидроксикоричных кислот методом хроматографии в траве *Nepeta cataria* L. / И. И. Тернинко, Т. Х. И. Нгуен // Сборник материалов IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «инновации в здоровье нации». – Санкт-Петербург. – 2016. – С. 622-627.
39. Тернинко, И. И. Идентификация фенольных соединений в траве котовника кошачьего (*Nepeta cataria* L.) / И. И. Тернинко, Т. Х. И. Нгуен // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2017. - №1 (18). – С. 120-124.
40. Тернинко, И. И. Критерии стандартизации лекарственного растительного сырья в фармакопеях стран ЕАЭС и ЕС / И. И. Тернинко, Т. Х. И. Нгуен // Фармация. – 2016. – № 8. – С. 5–8.
41. Тоцкая, С. А. Некоторые особенности выращивания нового сорта змееголовника молдавского селекции ФГБНУ ВИЛАР / С. А. Тоцкая, М. Ю. Грязнов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2018. - №9. – С.43-47.
42. Флора Европейской части СССР / под ред. А.А. Федорова. Т. 3. Л.: Наука. - 1978. - 259 с.
43. Хачирова, Ф. С. Технология и стандартизация сухого экстракта котовника крупноцветкового / Ф. С. Хачирова, В. А. Челомбитько, И. Н. Зилфикаров // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. – 2007. - №3. – С.83-85.
44. Aslanipour B., Heidari R., Farnad N. Phenolic Combination and Comparison of Antioxidant Activity in Three Different Alcoholic Extracts of *Dracosephalum moldavica* L. // Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology. – 2017. – Vol. 5(3). – P. 199-206,
45. Abdelhalim, A. et al. Antidepressant, anxiolytic and antinociceptive activities of constituents from *Rosmarinus officinalis* // J. Pharm. Pharm. Sci. - 2015. - Vol. 18(4). P. 448– 459.

46. Ahmad V. U., Bano S., Bano N. A triterpene acid from *Nepeta hindostana* / //Phytochemistry. - 1986. – V.25. – P. 1487–1488.
47. Akanda, M. R., et al. The biological and pharmacological roles of polyphenol flavonoid tilianin //European Journal of Pharmacology. – 2019. – V. 842. – P. 291-297
48. Akbay P., et al. In vitro immunomodulatory activity of verbascoside from *Nepeta ucrainica* L //Phytotherapy Research. - 2002. – V.16(6). – P. 593–595.
49. Anderson, W. et al. Investigation of the anxiolytic effects of naringenin, a component of *Mentha aquatica*, in the male Sprague-Dawley rat //Holist Nurs Pract. - 2012. - Vol. 26(1). - P. 52–57.
50. Aydin, S. Nepetalactone: a new opioid analgesic from *Nepeta caesarea* Boiss //J Pharm Pharmacol. - 1998. - Vol. 50. - P. 813–817.
51. Baiseitova, A. M. et al. Chemical constituents of *Dracocephalum nutans* //International Journal of Biology and Chemistry. – 2015. –V. 8 (2). – P. 90-97
52. Bertrand M. C., Tillequin F., Bailleul F. Two major flavonoids from *Ballota nigra* //Biochemical Systematics and Ecology. - 2000. - Vol. 28. - P. 1031–1033.
53. Bhandari S. S., Kabra M. P. To evaluate anti-anxiety activity of thymol //Journal of Acute Disease. - 2014. - Vol. 3(2). - P. 136–140.
54. Bhandari, S. P. S. et al. Ursane triterpenoids from *Nepeta eriostachia* //Phytochemistry. - 1990. – V. 29. – P. 3956–3958.
55. Cassani, J. et al. Anxiolytic-Like and Antinociceptive Effects of 2(S)-Neoponcirin in Mice //Molecules. - 2013. - Vol. 18. - P. 7584–7599.
56. Chang, H.M. et al. Structure-activity relationship of miltirone, an active central benzodiazepine receptor ligand isolated from *Salvia miltiorrhiza* Bunge (*Danshen*) //J Med Chem. - 1991. - Vol. 34. - P. 1675–1692.
57. Chiej R. The McDonald Encyclopedia of Medicinal Plants //London: McDonald and Co Ltd. - 1998. 204 p.
58. Coleta, M. et al. Comparative evaluation of *Melissa officinalis* L., *Tilia europaea* L., *Passiflora edulis* Sims. and *Hypericum perforatum* L. in the

- elevated plus maze anxiety test //Pharmacopsychiatry. - 2001. - Vol. 34(1). - P. 20–21.
59. Dabiri M., Sefidkon F. Chemical composition of *Nepeta crassifolia* Boiss. & Buhse oil from Iran //Flavour and Fragrance Journal. - 2003. –V. 18(3). – P. 225–227.
60. Daels-Rakotoarison, D.A. et al. Neurosedative and antioxidant activities of phenylpropanoids from *Ballota nigra* //Arzneimittelforschun. - 2000. - Vol. 50 (1). - P. 16–23.
61. Dai, L-M. et al. A new ferulic acid ester and other constituents from *Dracocephalum peregrinum* //Archives of Pharmacal Research. – 2008. – V. 31. – P.1325–1329
62. Dastmalchi, K. et al. Chemical composition and in vitro antioxidant evaluation of a watersoluble Moldavian balm (*Dracocephalum moldavica* L.) extract //LWT Food Sci Technol. - 2007. – V.40 P. 239–248.
63. De Carvalho R.S., Duarte F.S., de Lima T.C. Involvement of GABAergic non-benzodiazepine sites in the anxiolytic like and sedative effects of the flavonoid baicalein in mice //Behav Brain Res. - 2011. - Vol. 221 (1). - P. 75–82.
64. Eisenbraun, E. J., et al. Structure and Stereochemistry of 4 α β ,7 α ,7 α β -Nepetalactone from *Nepeta mussini* and Its Relationship to the 4 α α ,7 α ,7 α α - and 4 α α ,7 α ,7 α β -Nepetalactones from *N. cataria* //J. Org. Chem. – 1980. – V.45 (19). – P. 3811–3814
65. Fattahi, M. et al. Identification and quantification of leaf surface flavonoids in wild-growing populations of *Dracocephalum kotschyi* by LC–DAD–ESI-MS //Food Chemistry. - 2013. – V.141(1). – P.139–146.
66. Fernández, S. et al. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis* //Pharmacol. Biochem. Behav. - 2004. - Vol. 77. - P. 399–404.
67. Formisano C., Rigano D., Senatore F. Chemical Constituents and Biological Activities of *Nepeta* Species //Chemistry and Biodiversity. - 2011. - Vol. 8(10). - P. 1783–1818.

68. Fu, P. et al. New Flavonoid Glycosides and Cyanogenic Glycosides from *Dracocephalum peregrinum* //Chemical and pharmaceutical bulletin. - 2009. – V. 57(2). – P. 207–210.
69. Gilhotra N., Dhingra D. A review on antianxiety plants //Natural product radiance. - 2008. - Vol. 7. - No. 5. - P. 476–483.
70. Gkinis, G. et al. Chemical Composition and Biological Activity of *Nepeta parnassica* Oils and Isolated Nepetalactones //Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, Tübingen – 2003. – V. 58(9-10). – P. 681–686.
71. Gohari, A. R. et al. Flavonoid Constituents of *Dracocephalum kotschyi* Growing in Iran and Their Trypanocidal Activity //Natural Medicines. - 2003. – V.57(6). – P. 250-252.
72. Gomes, P.B. et al. Anxiolytic-like effect of the monoterpene 1,4-cineole in mice // Pharmacol Biochem Behav. - 2010. - Vol. 96(3). - P. 287–293.
73. González-Cortazar, M. et al. Isosakuranetin-5- O-rutinoside: a new flavanone with antidepressant activity isolated from *Salvia elegans* Vahl. //Molecules. - 2013. - Vol. 18 (11). - P. 13260–13270.
74. Gurgel do Vale, T. et al. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* //Phytomedicine. - 2002. - Vol. 9(8). - P. 709–714.
75. Harney J. W., Barofsky I. M., Leary J. D. Behavioral and toxicological studies of cyclopentanoid monoterpenes from *Nepeta cataria* //Lloydia. - 1978. - Vol. 41. - P. 367.
76. Hosseini A., Forouzanfar F., Rakhshandeh H. Hypnotic Effect of *Nepeta glomerulosa* on Pentobarbital-Induced Sleep in Mice //Jundishapur J Nat Pharm Prod. - 2016. - Vol. 11 (1). - P. 25063.
77. Hui, K. M. et al. Anxiolytic effect of wogonin, a benzodiazepine receptor ligand isolated from *Scutellaria baicalensis* Georgi //Biochem Pharmacol. - 2002. - Vol. 64(9). - P. 1415–1424.
78. Hussain J., Rehman N. U., Hussain H. Chemical constituents from *Nepeta clarkei* //Biochemical Systematics and Ecology. - 2010. – V. 38. – P.823–826

79. Hussein, A. H. Said-Al Ahl, et al. First Report of *Nepeta grandiflora* Grown in Egypt // International Journal of Life Science and Engineering. – 2015. - V. 1(3). - P. 93-96
80. Jäger A. K., Krydsfeldt K., Rasmussen H. B. Bioassay-guided isolation of apigenin with GABA-benzodiazepine activity from *Tanacetum parthenium* // Phytother. Res. - 2009. - Vol. 23. - P. 1642–1644.
81. Jahaniani, F. et al. Xanthomicrol is the main cytotoxic component of *Dracocephalum kotschyii* and a potential anti-cancer agent // Phytochemistry. - 2005. – V. 66(13). – P. 1581–1592.
82. Jamila, N. Secondary metabolites from *Nepeta juncea* // African Journal of Biotechnology. - 2011. – V.10. – P.17884–17886.
83. Jamzad, Z. et al. Leaf surface flavonoids in Iranian species of *Nepeta* (Lamiaceae) and some related genera // Biochemical Systematics and Ecology - 2003. – V.31(6). – P.587–600.
84. Janicsak, G. et al. Study of the oleanolic and ursolic acid contents of some species of the Lamiaceae // Biochemical Systematics and Ecology. - 2006. – V.34. – P.392–396
85. Javidnia, K. et al. Composition of the Essential Oil of *Dracocephalum kotschyi* Boiss. from Iran // Journal of Essential Oil Research. - 2005. – V.17(5). – P. 481–482.
86. Jerrold Meinwald. The Degradation of Nepetalactone¹ // J. Am. Chem. Soc. – 1954. – V.76 (18). – P. 4571–4573
87. Jiang, J. et al. Antioxidative and Cardioprotective Effects of Total Flavonoids Extracted from *Dracocephalum moldavica* L. Against Acute Ischemia/Reperfusion-Induced Myocardial Injury in Isolated Rat Heart // Cardiovascular Toxicology. - 2014. - V. 14. - P. 74–82
88. Jixin L., Zhongjian J. Chemical constituents of *Dracocephalum tanguticum* // Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica – 2006. – V. 26(1). – P. 188-192.

89. Johnston G.A., Beart P.M. Flavonoids: some of the wisdom of sage? // *Br. J. Pharmacol.* - 2004. - Vol. 142. - P. 809–810.
90. Kakasy, Zs. F. et al. Analysis of Non-volatile Constituents in *Dracocephalum* Species by HPLC and GC-MS // *Chromatographia Supplement.* – 2006. - V. 63. – P. S17-S22.
91. Kavvadias, D. et al. Constituents of sage (*Salvia officinalis*) with in vitro affinity to human brain benzodiazepine receptor // *Planta Med.* - 2003. - Vol. 69. - P. 113–117.
92. Kavvadias, D. et al. The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the bloodbrain barrier and exhibits anticonvulsive effects // *Br J Pharmacol.* - 2004. - Vol. 142 (5). - P. 811–820.
93. Khalil, A. T. et al. A Diterpene from *Nepeta septemcrenata* // *Phytochemistry.* – 1997 – V. 44(3). – P.475–478
94. Klimek B., Modnicki D. Terpenoids and sterols from *Nepeta cataria* L. var. *citriodora* (Lamiaceae) // *Acta Poloniae Pharmaceutica.* - 2005. – V. 62. – P. 231–235.
95. Kolouri, S. et al. *Nepeta menthoides* Boiss. et Buhse freeze-dried aqueous extract versus sertraline in the treatment of major depression: A double blind randomized controlled trial // *Complementary Therapies in Medicine.* - 2016. - Vol. 26. - P. 164–170.
96. Kumar D., Bhat Z. A. Apigenin 7-glucoside from *Stachys tibetica* Vatke and its anxiolytic effect in rats // *Phytomedicine.* - 2014. - Vol. 21(7). - P. 1010–1014.
97. Kumar, D. et al. Antianxiety activity of *Stachys tibetica* Vatke // *Chinese Journal of Natural Medicines.* - 2013. - Vol. 11 (3). - P. 240–244.
98. Kurkin V.A., Lamrini M., Klochkov S.G. Lavandoside from *Lavandula spica* flowers // *Chemistry of Natural Compounds.* - 2008. - V. 44(2). - P. 169–170.
99. Lallement-Guilbert N., Bézanger-Beauquesne L. Recherches sur les flavonoides quelques Labiees médicinales (romarin, menthe poivrée, suage

- officinale) // *Plantes Médicinales et Phytothérapie*. - 1970. - Vol. 4. - P. 92–107.
100. Lee, C.M. et al. Miltirone, a central benzodiazepine receptor partial agonist from a Chinese medicinal herb *Salvia miltiorrhiza* // *Neurosci Lett*. - 1991. - Vol. 127. - P. 237–241.
101. Lee, H. et al. Flavonoid wogonin from medicinal herb is neuroprotective by inhibiting inflammatory activation of microglia // *FASEB J*. - 2003. - Vol. 17(13). - P. 1943–1944.
102. Li, G.-P. et al. Three New Triterpenoids from *Dracocephalum forrestii* // *Helvetica Chimica Acta*. - 2006. – V.89(12). P. 3018–3022.
103. Li, S.M. et al. Chemical constituents of *Dracocephalum forrestii* // *Planta Med*. - 2009. – V.75. – P.1591–1596.
104. Lu Y., Foo Y. Polyphenolics of *Salvia* – a review // *Phytochemistry*. - 2002. - Vol. 59. - P. 117–140.
105. Luvah, G. M. et al. Anxiolytic-Like Effect of Underground Parts of *Ajuga remota* Benth (Lamiaceae) and Its Bioactive Constituents in Mice: A Behavioral Study // *The Natural Products Journal*.-2014. - Vol. 4(3). -P. 211–216.
106. Maimaitiyiming, D. et al. The treatment of Uyghur medicine *Dracocephalum moldavica* L on chronic mountain sickness rat model // *Pharmacogn Mag*. – 2014. - V.10(40). - P. 477–482.
107. Mamadalieva, N. Z. et al. Aromatic medicinal plants of the Lamiaceae family from Uzbekistan: ethnopharmacology, essential oils composition, and biological activities // *Medicines (Basel)*. – 2017. – Feb 10; P. 4 (1).
108. Marder, M. et al. Cirsiliol and caffeic acid ethyl ester, isolated from *Salvia guaranitica*, are competitive ligands for the central benzodiazepine receptors // *Phytomedicine*. - 1996. - Vol. 3 (1). - P. 29–31.
109. Martínez-Vázquez, M. et al. Neuropharmacological study of *Dracocephalum moldavica* L. (Lamiaceae) in mice: Sedative effect and

- chemical analysis of an aqueous extract //Journal of Ethnopharmacology. - 2012. - Vol. 141. - P. 908–917.
110. McElvain S. M., Bright R. D., Paul R. Johnson. The Constituents of the Volatile Oil of Catnip. I. Nepetalic Acid, Nepetalactone and Related Compounds // J. Am. Chem. Soc. – 1941. – V.63 (6). – P. 1558–1563
111. Melo, F.H. et al. Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission // Fundamental and Clinical Pharmacology. - 2010. - Vol. 24. - P. 437–443.
112. Metzman H. L. Monograph of *Scutellaria lateriflora* // Journal of the American Herbalists Guild. - 2006. - Vol. 7(1). - P. 4–18.
113. Miłkowska-Leyck, K. et al. Pharmacological effects of lavandulifolioside from *Leonurus cardiaca* // J Ethnopharmacol - 2002. - Vol. 80(1). - P. 85–90.
114. Mihaylova, D. et al. In Vitro Antioxidant Activity and Phenolic Composition of *Nepeta cataria* L. Extracts // International Journal of Agricultural Science and Technology (IJAST). – 2013. – Vol. 1(4)
115. Misra L., Shawl A., Raina V. Volatile Constituents of *Dracocephalum nutans* // *Planta Medica*. - 1988. –V. 54(02). – P.165–166.
116. Modnicki D., Tokar M., Klimek B. Flavonoids and phenolic acids of *Nepeta cataria* l. var. *citriodora* (becker) balb. (lamiaceae) // *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*. – 2007. - V. 64(3). - P. 247-252
117. Moridi Farimani, M. et al. Chemical composition and antibacterial activity of *Dracocephalum kotschyi* essential oil obtained by microwave extraction and hydrodistillation // *International Journal of Food Properties*. - 2017. – V.20(1). – P. 306–315.
118. Murai F., et al. A New Iridoid Glucoside, *Nepetariaside*, from *Nepeta cataria* // *Chem. Pharm. Bull.* – 1987. – V.35. - P 2533-2537
119. Murai, F. et al. 1R, 5R, 8S, 9S-Deoxyloganic Acid from *Nepeta cataria*. // *Chem. Pharm.Bull.* - 1984. V. 32(7) P. 2809 – 2814
120. Naguib, A.M.M. et al. Phytochemical screening of *Nepeta cataria* extracts and their in vitro inhibitory effects on free radicals and carbohydrate-

- metabolising enzymes // *Natural product research*. - 2011. - V. 26(23). - P. 2196-2198.
121. Nagy, T. et al. 2'-, 4'-, and 6'-O-substituted 1,5,9-epideoxyloganic acids from *Nepeta grandiflora* // *Phytochemistry*. – 1998. – V.47. – P.1067-1072.
122. Najafi, M. et al. Effects of Total Extract of *Dracocephalum moldavica* on Ischemia/Reperfusion Induced Arrhythmias and Infarct Size in the Isolated Rat Heart // *Iranian Journal of Basic Medical Sciences*. - 2009. - V. 11 (4). - P. 229-235
123. Nisar, M. et al. Antidepressant screening and flavonoids isolation from *Eremostachys laciniata* (L) Bunge // *African Journal of Biotechnology*. - 2011. - Vol. 10 (9). - P. 1696–1699.
124. Numonov S. R., Usmanova S. K., Aisa H. A. Chemical composition of *Dracocephalum heterophyllum* // *Chemistry of Natural Compounds*. – 2013. - V. 49(3). - P. 511-513
125. Olennikov D. N., Chirikova N. K. Dracopalmaside, a New Flavonoid from *Dracocephalum palmatum* // *Chemistry of Natural Compounds*. - 2015. –V. 51(6). – P.1067–1069.
126. Olennikov, D. et al. Chemical Composition and Antioxidant Activity of *Tánara Ótó* (*Dracocephalum palmatum* Stephan), a Medicinal Plant Used by the North-Yakutian Nomads // *Molecules*. - 2013. –V. 18(11). – P.14105–14121.
127. Olennikov, D. N. et al. New Glycosides of Eriodictyol from *Dracocephalum palmatum*. // *Chemistry of Natural Compounds*. - 2018. – V.54(5). – P. 860–863.
128. Pereira, P. et al. Neurobehavioral and genotoxic aspects of rosmarinic acid // *Pharmacological Research*. - 2005. - Vol. 52(3). - P.199–203.
129. Pereira, P. et al. Neuropharmacological Analysis of Caffeic Acid in Rats // *Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology*. - 2006. - N 99. - P. 374–378.

130. Pieretti S., et al. Pharmacological effects of phenylpropanoid glycosides from *Orobanchederaceae* // *Phytother Res.* - 1992. - Vol. 6 (2). - P. 89–93.
131. Pouraboli, I. et al. Antidiabetic, antioxidant, and antilipid peroxidative activities of *Dracocephalum polychaetum* shoot extract in streptozotocin-induced diabetic rats: In vivo and in vitro studies // *Pharmaceutical Biology.* - 2015. – V. 54(2). – P. 272–278.
132. Rabbani M., Sajjadi S. E., Mohammadi A. Evaluation of the Anxiolytic Effect of *Nepeta persica* Boiss. in Mice // *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.* - 2008. - Vol. 5 (2). - P. 181–186.
133. Rauwald, H.W. et al. GABAA Receptor Binding Assays of Standardized *Leonurus cardiac* and *Leonurus japonicas* Extracts as Well as Their Isolated Constituents // *Planta Med.* - 2015. - Vol. 81 (12/13). - P. 1103–1110.
134. Ren, D.-M. et al. Separation and structure determination of two diastereomeric pairs of enantiomers from *Dracocephalum rupestre* by high-performance liquid chromatography with circular dichroism detection // *Journal of Chromatography A.* – 2007. – V. 1161(1-2). – P. 334–337.
135. Ren, D.-M. et al. Simultaneous determination of nine major active compounds in *Dracocephalum rupestre* by HPLC // *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* – 2008. – V. 48(5). P. 1441–1445.
136. Ren, D.-M. et al. Stereochemistry of flavonoidal alkaloids from *Dracocephalum rupestre* // *Phytochemistry.* – 2008. – V.69(6). V. 1425–1433.
137. Renée J. Grayer, et al. The chemotaxonomic significance of two bioactive caffeic acid esters, nepetoidins A and B, in the Lamiaceae // *Phytochemistry.* – 2003. – V.64. – P. 519–528
138. Rutherford, D.M. et al. Isolation and identification from *Salvia officinalis* of two diterpenes which inhibit t-butylbicyclophosphoro-[³⁵S]-thionate binding to chloride channel of rat cerebrocortical membranes in vitro // *Neurosci Lett.* - 1992. - Vol. 135. - P. 224–226

139. Saeidnia, S. et al. Bioactive Compounds of the Volatile Oil of *Dracocephalum kotschyi* // *Zeitschrift Für Naturforschung C*. - 2007. – V. 62(11-12). – P. 793–796.
140. Saeidnia, S. et al. Two New Monoterpene Glycosides and Trypanocidal Terpenoids from *Dracocephalum kotschyi* // *Chemical and pharmaceutical bulletin*. - 2004. – V.52(10). – P. 1249–1250.
141. Salehi, B. et al. *Nepeta* species: From farm to food applications and phytotherapy // *J. Trends in Food Science & Technology*. - 2018. – V.80. – P.104–122.
142. Sarvestani, N. N. et al. Involvement of p-CREB and phase II detoxifying enzyme system in neuroprotection mediated by the flavonoid calycopterin isolated from *Dracocephalum kotschyi* // *Phytomedicine*. - 2013. – V. 20(10). – P.939–946.
143. Sastry, S. D. et al. Identification of 5,9-dihidronepetalactone a new monoterpene from *Nepeta cataria* // *Phytochemistry*. – 1972. – V. 11. - P. 453 – 455
144. Sharma, A. et al. Pharmacology and Toxicology of *Nepeta cataria* (Catmint) Species of Genus *Nepeta*: A Review // *Plant and Human Health*. – 2019. – V.3. P.285-299
145. Sharma, A., et al. The Genus *Nepeta*: Traditional uses, Phytochemicals and Pharmacological Properties // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2020. – V.268. – P.1-25
146. Shen J., Ye Y.H., Zhou Y.W. Bioactive chemical constituents from Tibetan Medicine *Dracocephalum tanguticum* Maxim // *Chin Pharm J*. - 2009. – V. 44. – P.170–175
147. Sherry C.J., Hunter P.S. The effect of an ethanol extract of catnip (*Nepeta cataria*) on the behavior of the young chick // *Experientia*. - 1979. - Vol. 35. - P. 237.

148. Snook, M. E. et al. Caffeoyltartronic acid from catnip (*Nepeta cataria*): A precursor for catechol in lubber grasshopper (*Romalea guttata*) defensive secretions // *Journal of Chemical Ecology*. - 1993. – V.19. – P.1957–1966.
149. Suganthi R.U., Manpal S. Biological and pharmacological actions carvacrol and its effects on poultry: An updated review // *J. Pharmacy and pharmaceutical Sciences*. – 2013 - 2(5). – P.3581-3595
150. Sultan, A. et al. Flavonoids from *Dracocephalum moldavica* // *Chemistry of Natural Compounds*. - 2008. - V. 44. - P. 366–367
151. Süntar, I. et al. Pharmacological and chemical features of *Nepeta L.* genus: Its importance as a therapeutic agent // *Phytotherapy Research*. – 2017. – V. 32(2). – P.1–14.
152. Tagawa M., Murai F. 5- Epideoxyloganic acid from *Nepeta cataria* // *Planta Med*. – 1983. – V.47(2). – C.109-111
153. Tagawa M., Murai F. A new iridoid glucoside, nepetolglucosylester from *Nepeta cataria* // *Planta Med*. – 1980. –V. 39(6). – P. 144-147
154. Takeda, Y. et al. Iridoid and eugenol glycosides from *Nepeta cadmea* // *Phytochemistry*. - 1998. –V. 49(3). – P.787–791.
155. Takeda, Y. Nepetacilicioside, a New Iridoid Glucoside from *Nepeta Cilicia* // *Journal of Natural Products*. – 1996. – V. 59(5). – P. 518–519.
156. Talari, M. et al. *Dracocephalum*: Novel Anticancer Plant Acting on Liver Cancer Cell Mitochondria // *BioMed Research International*. – 2014. – V. 2014. – P. 1–10.
157. Tan, Mei-e et al. Development of solid lipid nanoparticles containing total flavonoid extract from *Dracocephalum moldavica L.* and their therapeutic effect against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats // *Int J Nanomedicine*. -2017. V. 12. – P. 3253–3265.
158. Taviano, M. F. et al. Ursolic acid plays a role in *Nepeta sibthorpii* Benthams CNS depressing effects // *Phytotherapy Research*. – 2007.- V. 21(4). – P.382–385.

159. Tsuji, M. et al. Pharmacological characterization and mechanisms of the novel antidepressive- and/or anxiolytic-like substances identified from *Perillae Herba* // *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi*. - 2008. - Vol. 28 (4). - P. 159–167.
160. Uchiyama, N. et al. New Icetexane and 20-Norabietane Diterpenes with Trypanocidal Activity from *Dracocephalum komarovi* // *Journal of Natural Products*. - 2003. –V. 66. – P.128–131.
161. Viola, H. et al. Sedative and hypnotic properties of *Salvia guaranitica* St. Hil. and of its active principle, Cirsiolol. // *Phytomedicine*. - 1997. - Vol. 4 (1). - P. 47–52.
162. Vrchovska, V. et al. Antioxidative properties and phytochemical composition of *Ballota nigra* infusion // *Food Chemistry*. - 2007. - Vol. 105. - P. 1396–1403.
163. Wang, L. et al. Phenolic alkaloids from the aerial parts of *Dracocephalum heterophyllum* // *Phytochemistry*. - 2012. –V. 82. – P.166–171.
164. Wang, M. et al. Quantification of Nepetalactones in Catnip (*Nepeta cataria* L.) by HPLC Coupled with Ultraviolet and Mass Spectrometric Detection // *Phytochemical Analysis*. – 2007. – V.18. – P.157–160
165. Wang, S.-Q. et al. Dracotanosides A–D, Spermidine Glycosides from *Dracocephalum tanguticum*: Structure and Amide Rotational Barrier // *Journal of Natural Products*. - 2009. - 72(6). – P.1006–1010.
166. Wang, S.-Q. et al. Flavonoids from *Dracocephalum tanguticum* and their cardioprotective effects against doxorubicin-induced toxicity in H9c2 cells // *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*. - 2010. – V.20(22). – P.6411–6415.
167. Wojtyniak K., Szymański M., MatławskaI. *Leonurus cardiaca* L. (motherwort): a review of its phytochemistry and pharmacology // *Phytother Res*. - 2013. Vol. 27 (8). - P. 1115–1120.
168. Xie, S. et al. Absolute structure of nepetaside, a new iridoid glucoside from *Nepeta cataria* // *Phytochemistry*. – 1988. – V.27. – P. 469-472

169. Xu, J.-X. et al. Antioxidant Activities of *Dracocephalum tanguticum* Maxim Extract and Its Up-Regulation on the Expression of Neurotrophic Factors in a Rat Model of Permanent Focal Cerebral Ischemia // *The American Journal of Chinese Medicine*. – 2011. – V. 39(01). P. 65–81.
170. Yang S. et al. A new flavonoid glycoside and other constituents from *Dracocephalum moldavica* // *Natural Product Research*. – 2013. - Vol. 27(3). – P. 201–207
171. Yang, L.N. et al. Chemical constituents of *Dracocephalum Moldavica* L. and their pharmacological activities // *World Clin. Drugs*. - 2013. - V. 34. - P. 57.
172. Yang, L.-N. et al. The phenolic compounds from *Dracocephalum moldavica* L. // *Biochemical Systematics and Ecology*. – 2014 – V. 54. – P. 19–22.
173. Zeng, Q. et al. Chemical Constituents of Plants from the Genus *Dracocephalum* // *Chem. Bio-divers*. - 2010. – V.7. P. 1911-1929.
174. Zeng, Q. et al. New glycosides from *Dracocephalum tanguticum* Maxim // *Arch Pharm Res*. - 2011. – V.34 – V. 2015–2020
175. Zhang J.-L. et al. A new caffeic acid tetramer from the *Dracocephalum moldavica* L. // *Natural Product Research*. – 2017. – V. 32(3). – P. 370-373
176. Zhang X.F., Hu B.L., Wang S.X. The chemical constituents from *Dracocephalum tanguticum* Maxim // *Acta Bot. Sin*. - 1994. – V.36. – P.645–648
177. Zhang, R.-H. et al. Phytochemistry and pharmacology of the genus *Leonurus*: The herb to benefit the mothers and more // *Phytochemistry*. - 2018. - Vol. 147. - P. 167–183.
178. Zheng, H.T. et al. Liposoluble constituents of *Dracocephalum tanguticum* Maxim. (I) // *Chinese J. Med. Chem*. - 2007. – V.17. – P. 314–315.
179. Zhu, C.-S. et al. Antioxidant activities and hepatoprotective potential of *Dracocephalum rupestre* Hance extract against CCl₄ -induced hepatotoxicity in Kunming mice // *Journal of Food Biochemistry* - 2017. – V.42(2). –P. 1-8.

180. Zúñiga, M. I. J. et al. Antidepressant-Like Effects of *Dracocephalum moldavica* L. in Mouse Models of Immobility Tests // *Pharmacognosy Journal*. – 2019. – V. 11(5). – P. 976-983

Приложение 1. Патент на способ получения «Розматина» из травы змееголовника
молдавского



Приложение. 2 Акт внедрения проекта фармакопейной статьи (ФС)
«Змееголовника молдавского трава»

«УТВЕРЖДАЮ»

Генеральный директор ЗАО «ВИФИТЕХ»

С.А. Постельников

«10»

2020 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: Проект фармакопейной статьи (ФС) «Змееголовника молдавского трава».

Авторы (разработчики): Старший научный сотрудник отдела фитохимии и стандартизации, аспирант ФГБНУ ВИЛАР Е.В. Звездина, старший научный сотрудник отдела фитохимии и стандартизации ФГБНУ ВИЛАР Е.А. Коняева, старший научный сотрудник отдела фитохимии и стандартизации ФГБНУ ВИЛАР О.Г. Алентьева, научный сотрудник отдела фитохимии и стандартизации ФГБНУ ВИЛАР Т.А. Малютина

Источник информации: Материалы кандидатской диссертации Е.В. Звездиной на тему «Фитохимическое исследование некоторых видов растений семейства *Lamiaceae* Lindl.» (научный руководитель – главный научный сотрудник отдела фитохимии и стандартизации ФГБНУ ВИЛАР, доктор фармацевтических наук, профессор РАН И.Н. Зилфикаров).

Где внедрено: Фармацевтическое предприятие ЗАО «ВИФИТЕХ» (Московская область).

Цель внедрения: Расширение ассортимента выпускаемой ЗАО «ВИФИТЕХ» продукции новыми растительными препаратами нейротропного действия.

Ответственный за внедрение: Начальник отдела стандартизации ЗАО «ВИФИТЕХ» С.Н. Бумагина.

Эффективность и значимость внедрения: Проект ФС «Змееголовника молдавского трава» - нормативная документация на лекарственное растительное сырье (ЛРС), перспективное для создания новых лекарственных растительных препаратов нейротропного и кардиопротекторного действия. Государственная регистрация ФС позволит предприятию ЗАО «ВИФИТЕХ» начать промышленное производство субстанции «Розматин, экстракт сухой» и лекарственных форм на его основе.

Результаты внедрения: В условиях контрольно-аналитической лаборатории ОКК ЗАО «ВИФИТЕХ» на этапе входного контроля успешно апробированы методики анализа ЛРС, предложенные в проекте ФС «Змееголовника молдавского трава».

Начальник отдела стандартизации
ЗАО «ВИФИТЕХ»

С.Н. Бумагина

Приложение 3. Акт внедрения проекта нормативной документации «Розматин»,
экстракт сухой

«УТВЕРЖДАЮ»
 Генеральный директор ЗАО «ВИФИТЕХ»
 С.А. Постельников
 «16» 10 2020 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

Предмет внедрения: Проект нормативной документации (НД) «Розматин, экстракт сухой».

Авторы (разработчики): Ведущий научный сотрудник отдела фитохимии и стандартизации ФГБНУ ВИЛАР О.П. ШЕЙЧЕНКО; аспирант, старший научный сотрудник отдела фитохимии и стандартизации ФГБНУ ВИЛАР Е.В. ЗВЕЗДИНА; ведущий научный сотрудник отдела фитохимии и стандартизации ФГБНУ ВИЛАР В.И. ШЕЙЧЕНКО; старший научный сотрудник отдела фитохимии и стандартизации ФГБНУ ВИЛАР А.Е. БУРОВА

Источник информации: Материалы кандидатской диссертации Е.В. ЗВЕЗДИНОЙ на тему «Фитохимическое исследование некоторых видов растений семейства *Lamiaceae* Lindl.» (научный руководитель – главный научный сотрудник отдела фитохимии и стандартизации ФГБНУ ВИЛАР, доктор фармацевтических наук, профессор РАН И.Н. ЗИЛФИКАРОВ).

Где внедрено: Фармацевтическое предприятие ЗАО «ВИФИТЕХ» (Московская область).

Цель внедрения: Расширение ассортимента выпускаемой ЗАО «ВИФИТЕХ» продукции новыми растительными препаратами нейротропного действия.

Ответственный за внедрение: Начальник отдела стандартизации ЗАО «ВИФИТЕХ» С.Н. БУМАГИНА.

Эффективность и значимость внедрения: Проект НД «Розматин, экстракт сухой» регламентирует показатели и нормы качества субстанции растительного происхождения, полученной из травы змееголовника молдавского (*Dracocephalum moldavica* L., сем. *Lamiaceae*). Государственная регистрация НД позволит предприятию ЗАО «ВИФИТЕХ» начать промышленное производство субстанции «Розматин, экстракт сухой» и лекарственных форм на его основе, обладающих нейротропной и кардиозащитной активностью.

Результаты внедрения: В условиях контрольно-аналитической лаборатории ОКК ЗАО «ВИФИТЕХ» успешно апробированы методики анализа, предложенные в проекте НД, и подтверждены нормированные показатели качества субстанции «Розматин, экстракт сухой»

Начальник отдела стандартизации
 ЗАО «ВИФИТЕХ»



С.Н. БУМАГИНА

Приложение 4. Отчет о валидации методики количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту в траве змееголовника молдавского

Отдел стандартизации ФГБНУ ВИЛАР	
Количественное определение суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту в змееголовника молдавского (<i>Dracocephalum moldavica</i> L.) траве	№ М-04868244-79-2018
Отчет о валидации	Страница 1 из 15



УТВЕРЖДАЮ

Зам. директора ФГБНУ ВИЛАР

П.Г. Мизина

10 апреля 2018 г.

Методика

количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту змееголовника молдавского (*Dracocephalum moldavica* L.) травы (Отчет о валидации)

Ответственности	Должность	Ф.И.О.	Подпись	Дата
Согласовал:	Зав. отделом стандартизации	Сайбель О.Л.		10.04.2018 г.
Выполнил(-и):	С.н.с. отдела фитохимии	Звездина Е.В.		10.04.2018 г.
	В.н.с.отдела стандартизации	Дул В.Н.		10.04.2018 г.

Москва 2018

Приложение 5. Отчет о валидации методики количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту в субстанции «Розматин»

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЛЕКАРСТВЕННЫХ И АРОМАТИЧЕСКИХ РАСТЕНИЙ»
(ФГБНУ ВИЛАР)

Отдел фитохимии и стандартизации	
Методика количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту в субстанции «Розматин»	№ М-04868244-87-2020
Отчет о валидации	Страница 1 из 11

УТВЕРЖДАЮ

Заместитель директора

по научной работе ФГБНУ ВИЛАР,
доктор фармацевтических наук,
профессор



П.Г. Мизина

«22 декабря» 2020 г.

МЕТОДИКА

количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту в субстанции «Розматин»
(Отчет о валидации)

Ответственности	Должность	Ф.И.О.	Подпись	Дата
Согласовал:	Зав. отделом фитохимии и стандартизации	Сайбель О.Л.		22.12.2020 г.
Выполнил(-и):	С.н.с отдела фитохимии и стандартизации	Звездина Е.В.		10.02.2020 г.
	С.н.с отдела фитохимии и стандартизации	Бурова А. Е.		10.02.2020 г.

Москва-2020

Приложение 6. Спецификация экстракта сухого «Розматин»

Показатели	Методы	Нормы
Описание	Органолептический	аморфный порошок коричневого или красновато-коричневого или зеленовато-коричневого цвета со специфическим запахом, гигроскопичный.
Растворимость	ГФ РФ XIV ОФС.1.5.3.0007.15	Растворим в спирте этиловом, легко растворим в 50% спирте этиловом и мало растворим в воде
<p>Подлинность</p> <p>- флавоноиды</p> <p>- фенилпропаноиды</p>	<p>Качественные реакции:</p> <p>- реакция Шинода (5-7 капель конц. соляной кислоты+0,02 г металлического магния при нагревании)</p> <p>- ТСХ с реагентом алюминия хлорида</p>	<p>Розово-красное окрашивание</p> <p>На хроматограмме испытуемого раствора должны проявиться зоны адсорбции в УФ свете при длине волны 366 нм синевато-голубой флюоресценции с Rf около 0,82 розмариновой и Rf около 0,88 кофейной кислот.</p>

Влажность	ГФ РФ XIV ОФС.1.5.3.0007.15	Не более 5 %
Тяжелые металлы и мышьяк, мг/кг: свинец кадмий ртуть мышьяк	ГФ РФ XIV ОФС.1.5.3.0009.15	Не более 6,0 Не более 1,0 Не более 0,1 Не более 0,5
Радионуклиды, Бк/кг: цезий-137 стронций-90	ГФ РФ XIV ОФС.1.5.3.0001.15	Не более 400 Не более 200
Остаточные пестициды, мг/кг: α-гексахлорциклогексан и его изомеры) ДДТ и его метаболиты алдрин гептахлор	ГФ РФ XIV ОФС.1.5.3.0009.15	Не более 0,1 Не более 0,1 Не допускается Не допускается
Остаточные органические растворители, %	ГФ РФ XIV ОФС.1.1.0008.15	Не более 0,5
Микробиологическая чистота	ГФ РФ XIV ОФС.1.2.4.0002.18	Категория 3Б
Количественное определение	Спектрофотометрия	Суммы фенольных соединений в пересчете на розмариновую кислоту не менее 60 %
Хранение	В сухом, защищенном от света месте, при температуре не выше 25 °С	
Срок годности	2 года	

Приложение 7. Протокол изучения острой токсичности сухого экстракта
«Розматин»

Протокол
изучения острой токсичности сухого экстракта змееголовника
молдавского «Розматин»

В отдел экспериментальной и клинической фармакологии ФГБНУ ВИЛАР отделом фитохимии на изучение фармакологических свойств был представлен сухой экстракт змееголовника молдавского «Розматин» (сумма фенольных соединений 65,3% в пересчете на розмариновую кислоту). Паспорт препарата от 29.11.2018 г.

Цель: изучение острой токсичности сухого экстракта змееголовника молдавского «Розматин».

Материалы и методы:

В эксперименте использовались белые нелинейные мыши самцы в количестве 30 особей, массой 20-22 г, в группах по 6 животных. Первая группа – контрольная, животные, которые получают исследуемое вещество в дозах 500 мг/кг – вторая группа, 1000 мг/кг - третья, 1500 мг/кг – четвертая, 2000 мг/кг – пятая. Исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01.04.2016, Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (2012 г.) и в соответствии с Федеральными законами от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ (ред. от 28.11.2018 г.) «Об обращении лекарственных средств». Протокол биоэтической комиссии № 7. Определение параметров острой токсичности проводили по методу Кербера [1]. Сухой экстракт змееголовника молдавского «Розматин» растворяли в 1% крахмальном клейстере и вводили животным внутрижелудочно в дозах 500 мг/кг, 1000 мг/кг, 1500 мг/кг, 2000 мг/кг. Контрольной группе животных вводили дистиллированную воду в эквивалентном объеме. Наблюдение за поведением и состоянием

подопытных животных проводили в течение 14 суток, при этом отмечали изменение внешнего вида и поведенческих реакций мышей.

Результаты проведённого исследования:

Сухой экстракт змееголовника молдавского «Розматин» гибели животных во всех группах не вызвал, изменение внешнего вида и поведенческих реакций мышей не наблюдалось.

Выводы:

Так как гибели животных в течение всего периода наблюдения отмечено не было, не удалось установить LD_{50} исследуемого экстракта. Максимальная доза введения животным 2000 мг/кг. Сухой экстракт змееголовника молдавского «Розматин» относится к малотоксичным веществам, в соответствии с классификацией токсичности химических веществ по ГОСТу 12.1.007-76.

Сухой экстракт змееголовника молдавского «Розматин» по результатам изучения острой токсичности перспективен для дальнейшего изучения.

Список литературы:

1. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / 2-е изд., перераб. и доп. – Ленинград: Медгиз, 1963. – 146 с.

Исполнитель:

н.с. отдела экспериментальной и
клинической фармакологии,

Курманова Е.Н.

Зав. отделом экспериментальной и
клинической фармакологии

к.м.н.

Ферубко Е.В.

26.12.2018 г.

Подписи Курмановой Е.Н., Ферубко Е.В. заверяю:
Учёный секретарь, к. фарм. н. Селева Ольга Александровна



Приложение 8. Протокол изучения нейротропной активности и влияния на показатели сердечно-сосудистой системы сухого экстракта змееголовника молдавского «Розматин»

Протокол
изучения нейротропной активности и влияния на показатели
сердечно-сосудистой системы змееголовника молдавского сухого
очищенного экстракта «Розматин»

В отдел экспериментальной и клинической фармакологии ФГБНУ ВИЛАР из отдела фитохимии ФГБНУ ВИЛАР на исследование был представлен сухой экстракт змееголовника молдавского (надземная часть, фаза цветения, Северо-Кавказский филиал, опыт № 1-2017) под уловным названием «Розматин»

Целью исследования стало изучение влияния курсового введения змееголовника молдавского в дозах 10 и 100 мг/кг на показатели деятельности сердечно-сосудистой системы (частоту сердечных сокращений, систолическое и диастолическое артериальное давление) и нервной системы (в тестах по изучению спонтанной двигательной активности и влиянию на параметры хлоралгидратного сна) мышей.

Опыты проводили на белых нелинейных мышках массой 18-22 г в количестве 32 особей. Мышей содержали в условиях вивария ФГБНУ ВИЛАР на стандартном рационе. Лабораторные животные были разделены на четыре группы по 8 особей: первая – контрольные животные, вторая, третья и четвертая группы – опытные. Вторая и третья опытные группы мышей получали исследуемое вещество - экстракт змееголовника молдавского в дозах 10 и 100 мг/кг, четвертая группа получала препарат сравнения валерианы экстракт (таблетки, содержащие 20 мг густого экстракта валерианы) в дозе 100 мг/кг. Все вещества растворяли в 1% крахмальной взвеси и вводили внутривентрикулярно в течение 4-5 дней, контрольные животные получали эквивалентный объем 1% крахмального клейстера.

На 4-й день эксперимента через 30 минут после внутривентрикулярного введения веществ и 1% крахмальной взвеси проводили изучение в динамике спонтанной двигательной активности мышей по стандартной методике, используя актометр фирмы Ugo Basile (Италия) с автоматической регистрацией. В ходе опыта мышей помещали по четыре особи в каждую из двух камер прибора на пять минут для изучения спонтанной двигательной активности в динамике в течение двух часов: через 30, 60, 90 и 120 минут.

В этот же день у животных измеряли частоту сердечных сокращений, систолическое и диастолическое артериальное давление с использованием аппаратно-программных комплексов «Систола» и «Флогистон» (производитель ООО «Нейроботикс», г. Москва). Перед измерением артериального давления мышей помещали в контейнеры-ограничители на 30 минут, подогревая до 37°С на нагревательной платформе «Флогистон». Система неинвазивного измерения кровяного давления у лабораторных

животных «Систола» с помощью встроенной электрической воздушной помпы автоматически нагнетает под давлением воздух в хвостовую манжету до прекращения пульсаций кровотока, а затем, медленно снижая в манжете давление, автоматически измеряет систолическое и рассчитывает диастолическое давление на основе показаний инфракрасного датчика пульса, одеваемого на хвост животного после манжеты. Система «Флогистон» предназначена для поддержания заданной температуры при подогреве мелких лабораторных животных. Подогрев мышей необходим для корректного проведения измерения давления, так как нагревание обеспечивает стабильную, с достаточным объемом, циркуляцию крови в хвосте.

На 5-й день эксперимента проводили изучение влияния экстракта «Розматина» на параметры сна, вызванного «корковым снотворным анализатором» хлоралгидратом. Раствор хлоралгидрата готовили непосредственно перед употреблением на физиологическом растворе хлорида натрия 0,9%. Вводили хлоралгидрат внутривентриально в дозе 350 мг/кг контрольным и опытным группам мышей через 30 минут после внутрижелудочного введения 1% крахмальной взвеси и изучаемого экстракта «Розматина» в дозах 10 и 100 мг/кг и препарата сравнения экстракта валерианы в дозе 100 мг/кг, соответственно. Время засыпания отмечали по боковому положению животных, время пробуждения фиксировали по принятию животными обычной позы при открытых глазах и груминге. Период наблюдения продолжительности сна составлял 4 часа.

Результаты изучения влияния курсового введения экстракта змееголовника молдавского на спонтанную двигательную активность мышей в динамике представлены в таблице 1.

Таблица 1. Влияние курсового введения экстракта змееголовника молдавского в дозах 10 и 100 мг/кг на спонтанную двигательную активность мышей

Препарат, доза	Спонтанная двигательная активность, число импульсов			
	Через 30 мин, M±s	Через 60 мин, M±s	Через 90 мин, M±s	Через 120 мин, M±s
Контроль	235,0±17,0	227,5±53,0	135,5±68,6	91,0±4,2
Розматин, 10 мг/кг	278,0±76,4	229,0±56,6	174,5±44,5	156,5±24,7*
Розматин змееголовника молдавского, 100 мг кг	259,0±76,4	228,5±78,5	175,5±27,6	113,5±34,6
Таблетки валерианы	232,5±101,1	157,5±3,5*	130,5±33,2	101,0±48,1

экстракт, 100 мг/кг				
---------------------	--	--	--	--

* - достоверность опытных показателей по критерию Манна-Уитни $p \leq 0,05$

Как видно из таблицы 1, после курсового 4-х дневного введения образца Розматина в дозах 10 и 100 мг/кг регистрировалась фазовая динамика спонтанной двигательной активности мышей в течение 2-х часового периода тестирования. В первые 30 минут отмечалась тенденция к активирующему действию Розматина, проявляющаяся повышением спонтанной двигательной активности опытных мышей на 18 % и 10 % - для доз 10 и 100 мг/кг, соответственно, по сравнению с группой контроля. Через 60 минут после введения исследуемого образца змееголовника в дозах 10 и 100 мг/кг двигательная активность опытных мышей практически не отличалась от контрольных животных. С 90-й минуты вновь регистрировалось повышение спонтанной двигательной активности опытных мышей, получавших змееголовник молдавский в дозах 10 и 100 мг/кг - на 28-29 % по сравнению с группой контроля. К концу 2-х часового периода тестирования активирующий эффект змееголовника молдавского был достоверным в дозе 10 мг/кг и сопровождался усилением спонтанной двигательной активности на 72 % по сравнению с группой контроля, в дозе же 100 мг/кг возбуждающий эффект был менее значительным (на 24%) и не достигал достоверных значений.

Действие препарата сравнения – таблеток экстракта валерианы в дозе 100 мг/кг характеризовалось достоверным (на 60-й минуте) снижением спонтанной двигательной активности мышей на 44 % по сравнению с контрольными животными.

В таблице 2 приведены результаты влияния курсового введения «Розматина» в дозах 10 и 100 мг/кг на показатели сердечно-сосудистой системы мышей.

Таблица 2. Влияние курсового введения экстракта змееголовника молдавского в дозах 10 и 100 мг/кг на показатели сердечно-сосудистой системы мышей: на систолическое, диастолическое и пульсовое артериальное давление (АД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС)

Препарат, доза	Систолическое АД, мм рт.ст.	Диастолическое АД, мм рт.ст.	Пульсовое АД, мм рт.ст.	ЧСС, ударов в мин
Контроль	103 [100÷109] 104,7±9,1	74 [71÷77] 74,0±6,6	29 [26÷35] 30,8±8,1	489 [441÷639] 527,2±96,0
Розматин, 10 мг/кг	116 [106÷130] * 116,3±12,2*	74 [73÷80] 77,0±8,8	37 [29÷49]* 39,3±11,8*	650 [636÷683] * 651,8±42,5*

Розматин, 100 мг/кг	115 [108÷121] * 113,9±10,5*	75 [70÷82] 75,9±7,8	39 [30÷45]* 38,0±9,3*	660 [601÷677] * 631,9±68,1*
Таблетки валерианы экстракт, 100 мг/кг	105,5 [97,5÷113,0] 106,4±10,0	75,5 [67,0÷81,5] 74,3±8,6	31,0 [26,0÷40,0] 32,9±7,5	550 [483,5÷562,0] 511,6±89,0

Примечание: при распределении признаков, отличном от нормального, приведены: Me [25-й ÷ 75-й процентиля], где Me – медиана, [25-й ÷ 75-й процентиля] – интерквартильный размах; при нормальном распределении: $M \pm s$, где M – среднее значение, s – среднее квадратическое отклонение, при этом $M=Me$;

* - достоверность опытных показателей по критерию Манна-Уитни $p \leq 0,05$

Как видно из таблицы 2, после курсового введения змееголовника молдавского в дозах 10 и 100 мг/кг наблюдалось **достоверное повышение систолического (на 13 % и 11 %, соответственно) и пульсового (на 36 % и 31 %, соответственно) артериального давления** у опытных мышей по сравнению с группой контроля, а также регистрировался **достоверный положительный хронотропный эффект - учащение сердечных сокращений на 24 % и 20 %, соответственно**, по сравнению с контрольными животными. Препарат сравнения не вызывал каких-либо значимых изменений артериального давления и частоты сокращений сердца у мышей по сравнению с контрольными животными.

В таблице 3 приведены данные о влиянии 5-ти дневного курсового введения экстракта змееголовника молдавского в дозах 10 и 100 мг/кг на параметры сна, вызванного «снотворным анализатором» хлоралгидратом.

Как видно из таблицы 3, курсовое 5-ти дневное введение исследуемого образца змееголовника молдавского приводило к увеличению продолжительности сна, вызванного «корковым снотворным анализатором» хлоралгидратом, то есть потенцировало корковое торможение и снотворный эффект хлоралгидрата, причем в дозе 100 мг/кг усиление снотворного действия носило **достоверный характер (длительность сна увеличилась на 36 % по сравнению с контрольными животными)**. Курсовое введение препарата сравнения - экстракта валерианы в дозе 100 мг/кг в нашем эксперименте сопровождалось менее значительным (на 13 % по сравнению с группой контроля) увеличением продолжительности хлоралгидратного сна.

Таблица 3. Влияние курсового введения экстракта змееголовника молдавского в дозах 10 и 100 мг/кг на параметры сна, вызванного «снотворным анализатором» хлоралгидратом

Препарат, доза	Латентный период сна, мин	Продолжительность сна, мин
Контроль	5,0 [4,0÷5,0]	117,0 [83,0÷149,0]

	4,6±1,5	120,3±33,6
Розматин, 10 мг/кг	4,0 [3,0÷7,5] 5,0±2,6	152,5 [100,0÷177,0] 143,3±55,2
Розматин, 100 мг/кг	7,0 [4,5÷8,0] * 6,5±2,0*	152,5 [126,5÷208,5] * 163,4±35,3*
Таблетки валерианы экстракт, 100 мг/кг	5,0 [4,5÷6,5] 4,5±1,2	124,5 [120,5÷141,5] 136,4±35,6

Примечание: при распределении признаков, отличном от нормального, приведены: Me [25-й ÷ 75-й процентиля], где Me – медиана, [25-й ÷ 75-й процентиля] – интерквартильный размах; при нормальном распределении: $M \pm s$, где M – среднее значение, s – среднее квадратическое отклонение, при этом $M=Me$;

* - достоверность опытных показателей по критерию Манна-Уитни $p \leq 0,05$

Отдельно следует обсудить влияние змееголовника молдавского на латентный период сна, то есть на период засыпания. Если курсовое введение змееголовника молдавского в дозе 10 мг/кг практически не оказывало достоверного влияния на скорость засыпания мышей под действием хлоралгидрата, то курсовой прием змееголовника молдавского в дозе 100 мг/кг достоверно увеличивал время засыпания на 41 % по сравнению с контрольными животными. Курсовое введение препарата сравнения - экстракта валерианы в дозе 100 мг/кг практически не оказывало влияния в нашем эксперименте на латентный период хлоралгидратного сна.

Таким образом, в данном эксперименте был выявлен **фазовый** характер нейропсихотропной активности исследуемого образца змееголовника молдавского в дозе 100 мг/кг - *после фазы активирующего влияния на центральную нервную систему наблюдалось потенцирование коркового торможения, вызванного хлоралгидратом.*

Выводы.

Изучение влияния курсового введения змееголовника молдавского (экстракт «Розматин», надземная часть, фаза цветения, Северо-Кавказский филиал, опыт №1-2017) в дозах 10 и 100 мг/кг на показатели деятельности сердечно-сосудистой системы и нервной системы мышей показало следующее:

1. Исследуемый образец змееголовника молдавского в дозе 10 мг/кг достоверно усиливает спонтанную двигательную активность мышей - в 1,72 раза по сравнению с группой контроля - через 2 часа после начала тестирования.
2. Исследуемый образец в дозах 10 и 100 мг/кг вызывает достоверное повышение систолического (на 13 % и 11 %, соответственно) и пульсового (на 36 % и 31 %, соответственно) артериального давления по сравнению с группой контроля, а также демонстрирует

достоверный положительный хронотропный эффект - учащение сердечных сокращений на 24 % и 20 %, соответственно, по сравнению с контрольными животными.

3. Исследуемый образец в дозе 100 мг/кг оказывает достоверное фазовое действие на параметры сна, вызванного «корковым снотворным анализатором» хлоралгидратом: после фазы активирующего влияния на центральную нервную систему, характеризующегося увеличением времени засыпания (латентного периода сна) в 1,4 раза по сравнению с группой контроля, затем наблюдалось потенцирование коркового торможения, вызываемого хлоралгидратом, и увеличение общей продолжительности сна в 1,36 раза по сравнению с контрольными животными.

Таким образом, исследуемый образец змеголовника молдавского («Розматин», надземная часть, фаза цветения, Северо-Кавказский филиал, опыт №1-2017) обладает активирующим, тонизирующим действием на сердечно-сосудистую и нервную системы.

Руководитель Центра медицины
д.м.н., профессор

Панина - М.И. Панина
16.04.18г.

Ответственный исполнитель
в.н.с., к.б.н.

В.П. Панин

16.04.18

*Подписи М.И. Паниной, д.м.н., профессора и
В.П. Панина, к.б.н.*

заверено

*Удостоверен секретарь ФГБНУ ВИЛАР
к. фарм. н. Семкина О.А.*



Семкина

Приложение 9. Протокол исследования нейротропной активности экстракта змееголовника молдавского под условным названием «Розматин» на модели приподнятый крестообразный лабиринт

Протокол исследования нейротропной активности экстракта змееголовника молдавского под условным названием «Розматин» на модели приподнятый крестообразный лабиринт

Цель: Изучить влияние на центральную нервную систему и поведение животных однократного введения экстракта Розматина на моделях «приподнятый крестообразный лабиринт»

Исследуемый объект: экстракт Розматин в дозах 10 и 100 мг/кг

Препарат сравнения: таблетки экстракта пустырника (таблетки, содержащие 14 мг густого экстракта) в дозе 100 мг/кг

Материалы и методы:

Эксперименты проведены согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01.04.2016, Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ 33044-2014) «Принципы надлежащей лабораторной практики», «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (2012 г.) и в соответствии с Федеральными законами от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ (ред. от 28.11.2018 г.) «Об обращении лекарственных средств». Производитель животных – Филиал «Андреевка» ФГБУН «НЦБТ» ФМБА России (Московская область). Животные содержались в виварии ФГБНУ ВИЛАР на стандартном рационе. Исследования одобрены биоэтической комиссией ФГБНУ ВИЛАР.

В экспериментах задействовали белых нелинейных мышей массой тела 18 – 22 г в количестве 32 особей.

Подопытные животные (32 мыши) были разделены на 4 группы по 8 особей: первая – контрольные животные. Животные, которые получали экстракт в дозе 10 мг/кг – вторая группа, 100 мг/кг – третья. Животные, которые получали препарат сравнения - экстракт пустырника в дозе 100 мг/кг – четвёртая группа. Экстракт Розматин и экстракт пустырника суспендировали в 1% крахмальной взвеси. Контрольной группе животных вводили внутривенно 1% крахмальную взвесь. Через 30 минут после

введения препаратов было изучено влияние экстракта Розматин и экстракта пустырника на поведение мышей в условиях модели «крестообразного приподнятого лабиринта» с открытыми и замкнутыми коридорами. Эксперимент проводили по общепринятой методике: животных помещали в центр лабиринта и в течение трёх минут наблюдали за их передвижениями. Против тревожный эффект экстрактов подтверждался более длительным пребыванием животных на открытой доске лабиринта, по сравнению с контролем. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета программ Statistica 10,0 (США). Значимость различий между выборками с распределением, приближающимся к нормальному, оценивали с помощью t-критерия Стьюдента. Различия принимали значимыми при $p \leq 0,05$.

Таблица 1. Влияние экстракта змееголовника молдавского под условным названием «Розматин» на поведение мышей на модели «крестообразный приподнятый лабиринт»

Вариант опыта, n=8	Время на открытой доске, с, (M ± m)
Контроль	18,25±2,53
Розматин, 10 мг/кг	24,85±2,64
Розматин, 100 мг/кг	28,62±1,24*
Пустырник, 100мг/кг	32,28±2,43*

Примечание: * - различия статистически значимы по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$

Результаты изучения влияния на центральную нервную систему и поведение животных однократного введения экстракта Розматина на моделях «приподнятый крестообразный лабиринт» представлен в таблице 1. По результатам изучения влияния экстракта Розматина на поведение мышей на

модели «крестообразный приподнятый лабиринт», представленным в таблице 1, установлено, что изучаемый экстракт в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг удлиняет время пребывания животных на открытой доске по сравнению с контролем на 36% и 57%, оказывает достоверно выраженное снижение нервно-эмоционального напряжения в поведении животных. Референтный препарат пустырник в дозе 100 мг/кг удлиняет время пребывания животных на открытой доске на 77 % по сравнению с контролем, оказывает выраженное снижение нервно-эмоционального напряжения в поведении животных, превосходящее действие Розматина.

Выводы:

Проведенные экспериментальные исследования по изучению нейротропной активности экстракта змееголовника молдавского под условным названием «Розматин» показали, что данный экстракт при однократном введении уменьшает нервно-эмоциональное напряжение животных. Таким образом, экстракт змееголовника молдавского под условным названием «Розматин» является перспективным объектом для дальнейшего углублённого изучения с целью создания новых лекарственных препаратов растительного происхождения.

Литература:

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
2. Лакин Г. Ф. Биометрия. М. – 1990. – С. 113-130

Исполнители:

Научный сотрудник отдела экспериментальной фармакологии



Курманова Е.Н.

Заведующий отделом экспериментальной и клинической фармакологии

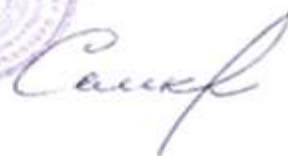


Ферубко Е.В.

Подписи исполнителей заверяю

Учёный секретарь ФГБНУ ВИЛАР

к. фарм. н.

Семкина О.А.

Приложение 10. Протокол изучения нейротропной активности змееголовника молдавского экстракта сухого под условным названием «Розматин» на модели «открытое поле» у крыс

Протокол эксперимента

Изучение нейротропной активности змееголовника молдавского экстракта сухого под условным названием «Розматин» на модели «открытое поле» у крыс

Цель: Изучить влияние 4 дневного введения змееголовника молдавского экстракта сухого под условным названием «Розматин» на модели «открытое поле» у крыс

Исследуемый объект: змееголовника молдавского экстракт сухой под условным названием «Розматин» в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг.

Препарат сравнения: таблетки экстракта пустырника (ЗАО «ВИФИТЕХ») в дозе 100 мг/кг.

Материалы и методы:

В эксперименте были задействованы белые нелинейные крысы массой тела 180 – 220 г в количестве 32 особи. Производитель животных – Филиал «Андреевка» ФГБУН «НЦБТ» ФМБА России (Московская область). Животные содержались в виварии ФГБНУ ВИЛАР на стандартном рационе. Перед началом эксперимента животные находились на карантине 14 дней. Доклинические исследования лекарственных препаратов выполняли согласно Решению Совета ЕЭК от 03.11.2016 №81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики ЕАЭС», Национальному стандарту Российской Федерации ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (2012 г.) и в соответствии с Федеральными законами от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» и от 22.12.2014 г. № 429-ФЗ «О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств».

Для изучения основных параметров поведения и неврологического статуса в условиях кратковременного психоэмоционального стресса тест проведён на установке «открытое поле норкового типа», отличающейся

отсутствием боковых стенок и, вследствие этого, более высокой стрессогенностью. Опытные животные были разделены на четыре группы по 8 особей: первая – контрольные животные. Животные, которые получали исследуемое вещество – вторая группа и третья, а препарат сравнения – четвертая группа. Изучаемые препараты были суспендированы в 1% крахмальном клейстере и вводились внутривентрикулярно. На 4 день эксперимента изучено их влияние на нервную деятельность на модели «открытое поле». Через 30 минут после последнего введения препарата крыс помещали на середину поля и наблюдали за их поведением в течение трех минут. Тест позволяет определять двигательную-ориентировочную и исследовательскую активность животных, уровень эмоциональности, выявить неврологические нарушения (дрожь, подергивания век, щек, мигания), а также аномальное поведение: стереотипию, встряхивания.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью пакета программ статистического анализа *Statistica 10,0*. Для оценки значимости отличий между выборками с распределением, приближающимся к нормальному, использовался *t* критерий Стьюдента. Критический уровень значимости *P* при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты и обсуждение:

Результаты изучения влияния 4 дневного введения змееголовника молдавского экстракта сухого под условным названием «Розматин» на модели «открытое поле» у крыс представлены в таблице.

Изучение нейротропной активности змееголовника молдавского экстракта сухого под условным названием «Розматин» на модели «открытое поле» у крыс 21.01.2021

Показатели	Контроль	Змееголовн ик 10 мг/кг	Змееголовн ик 100мг/кг	Пустырник 100 мг/кг
Горизонтальная активность	8,1±0,93	8,9±1,27 10%	8,9±0,78 10%	8,5±0,68 5%
Заглядывание в отверстия	8,9±0,92	9,8±0,66 10%	10,8±1,56 21%	9,8±1,63 10%

Вертикальная активность	3,5±0,71	3,1±0,92	4,0±1,00 14%	3,1±0,78
Стойка	1,0±0,70	1,0±1,22	1,9±1,26 90%	1,1±0,70 10%
Грумминг	0	0	0	0
Встряхивание	0	0	0	0
Неврологические нарушения	0	0	0	0
Стереотипия	0	0	0	0
Напряжение хвоста	0	0	0	0
Число булюсов	3,6±0,99	1,3±0,82 36%	0,3±0,47 83%	0,3±0,48 83%

Примечание: * - отличия от контроля достоверны при $p < 0,05$

Змееголовника экстракт в дозе 10 мг/кг увеличивал горизонтальную активность на 10%, заглядывание в отверстия на 10%, уменьшал число булюсов на 36%. В дозе 100 мг/кг экстракт увеличивал горизонтальную активность на 10%, вертикальную активность на 14%, заглядывание в отверстия на 21%, стойку – на 90%, уменьшал число булюсов на 83%. Пустырника экстракт также уменьшал число булюсов на 83%, на остальные параметры воздействовал незначительно. Змееголовника молдавского экстракт сухой под условным названием «Розматин» в данном эксперименте увеличивал двигательную-ориентировочную и исследовательскую активность животных. Уровень эмоциональности экстракт снижал сопоставимо с препаратом сравнения.

У подопытных животных в данном эксперименте не выявлено неврологических нарушений (дрожь, подёргивание век, щёк, мигание), а также аномального поведения (стереотипия, встряхивание).

Выводы:

Змееголовника молдавского экстракт сухой под условным названием «Розматин» в условиях модели «открытое поле» увеличивал двигательную-

ориентировочную и исследовательскую активность животных, а также снижал уровень эмоциональности. В данном эксперименте у подопытных животных не выявлено неврологических нарушений, аномального поведения.

Исполнители:

Научный сотрудник отдела
экспериментальной фармакологии

Е.Н. Курманова

Инженер I категории отдела
экспериментальной фармакологии

Р.К. Курманов

Зав. отделом экспериментальной
фармакологии ФГБНУ ВИЛАР

Е.В. Ферубко

Старший научный сотрудник
отдела химии природных соединений

Е. В. Звездаина

Подписи исполнителей заверяю

Учёный секретарь ФГБНУ ВИЛАР

к. фарм. н.



Семкина О.А.

Приложение 11. Протокол изучения нейротропной активности «Розматина»

Протокол эксперимента**Изучение нейротропной активности экстракта змееголовника молдавского под условным названием «Розматин» четырёхкратное введение**

Цель: Изучить влияние на нервную деятельность животных однократного введения экстракта Розматина на модели «хлоралгидратный сон» у мышей при четырёхдневном введении.

Исследуемый объект: экстракт Розматин в дозах 10 и 100 мг/кг.

Препарат сравнения: таблетки экстракта пустырника (таблетки, содержащие 14 мг густого экстракта) в дозе 100 мг/кг.

Материалы и методы:

Эксперименты проведены согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01.04.2016, Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (2012 г.) и в соответствии с Федеральными законами от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ (ред. от 28.11.2018 г.) «Об обращении лекарственных средств». Производитель животных – Филиал «Андреевка» ФГБУН «НЦБТ» ФМБА России (Московская область). Животные содержались в виварии ФГБНУ ВИЛАР на стандартном рационе.

В экспериментах задействовали белых нелинейных мышей массой 18 – 22 г в количестве 32 особей.

Подопытные животные были разделены на 4 группы по 8 особей: первая – контрольные животные. Животные, которые получали экстракт в дозе 10 мг/кг – вторая группа, 100 мг/кг – третья. Животные, которые получали препарат сравнения - экстракт пустырника в дозе 100 мг/кг – четвёртая группа. Экстракт Розматин и экстракт пустырника ресуспендировали в 1% крахмальной взвеси. Контрольной группе животных вводили внутривенно 1% крахмальную взвесь. Через 1 час после

введения исследуемого препарата животным раздавали корм. На 4 день эксперимента через 30 минут после внутрижелудочного введения препаратов, всем экспериментальным животным внутривентриально вводили хлоралгидрат в дозе 350 мг/кг.

Время засыпания отмечали по боковому положению экспериментальных животных. Время пробуждения отмечено по принятию животными обычной позы при открытых глазах и груминге. Период наблюдения продолжительности сна – 4 часа.

Таблица 2. Влияние экстракта змееголовника молдавского под условным названием «Розматин» на параметры сна, вызванного хлоралгидратом у мышей при четырёхдневном введении

Вариант опыта N=8	Время латентного периода (секунды)	Время сна (минуты)
Контроль	83±13	229±22,13
Розматин 10мг/кг	53±13	187±11,50*
Розматин 100мг/кг	49±14	181±13,70*
Пустырник 100 мг/кг	48±13	242±1,60*

Примечание: * - отличия от контроля достоверны при $p < 0,05$

По результатам проведенного эксперимента установлено, что изучаемый экстракт в исследуемых дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг вызывает сокращение латентного периода сна на 36% и 41% по сравнению с контролем. Экстракт в исследуемых дозах достоверно уменьшает

продолжительность сна на 18% и 21% соответственно, по сравнению с контролем.

Референтный препарат Пустырник в дозе 100 мг/кг вызывает сокращение латентного периода сна на 42% по сравнению с контролем, достоверно **увеличивает** продолжительность сна на 7% по сравнению с контролем.

Выводы:

Проведенные экспериментальные исследования по изучению нейротропной активности экстракта змееголовника молдавского под условным названием «Розматин» показали, что данный экстракт вызывает сокращение латентного периода сна, достоверно уменьшает продолжительность сна. Таким образом, экстракт змееголовника молдавского под условным названием «Розматин» является перспективным объектом для дальнейшего углублённого изучения с целью создания новых лекарственных препаратов растительного происхождения.

Литература:

1. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – С.13-24.
2. Лакин Г.Ф. Биометрия. М. – 1990. – С.113-130.

Исполнители:

Научный сотрудник отдела экспериментальной фармакологии

Курманова Е.Н.

Заведующий отделом экспериментальной и клинической фармакологии

Ферубко Е.В.

Подписи исполнителей заверяю

Учёный секретарь ФГБНУ ВИЛАР

к. фарм. н.



Семкина О.А.

Приложение 12. Протокол изучения экстракта на экссудативную стадию воспаления на модели 1 % формалинового отёка

Протокол изучения змееголовника молдавского травы экстракта сухого под условным названием «Розматин».

В ФГБНУ ВИЛАР разработан змееголовника молдавского травы экстракт сухой под условным названием «Розматин» (сумма фенольных соединений 65,3% в пересчете на розмариновую кислоту).

Цель: фармакологическое изучение змееголовника молдавского травы экстракта сухого под условным названием «Розматин».

Исследуемый объект: змееголовника молдавского травы экстракт сухой под условным названием «Розматин» в дозах 10 мг/кг, 100 мг/кг.

Препарат сравнения: В качестве препарата сравнения был использован индометацин в дозе 5 мг/кг.

Методы исследования

Изучена противовоспалительная активность экстракта змееголовника молдавского. В работе были использованы белые нелинейные мыши самцы. Масса тела животных – 19-20 г. Эксперименты проведены в соответствии с правилами лабораторной практики (GLP), приказом МЗ РФ №199 от 2016 г. «Об утверждении правил лабораторной практики», «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Москва, 2012). Исследования одобрены Биоэтической комиссией ФГБНУ ВИЛАР. Производитель животных – Филиал «Андреевка» ФГБУН «НЦБТ» ФМБА России (Московская область). Животные содержались в виварии ФГБНУ ВИЛАР на стандартном рационе. Оценку влияния экстракта на экссудативную стадию воспаления проводили на модели 1% формалинового отёка в дозах 10 мг/кг, 100 мг/кг при введении экстракта змееголовника внутрижелудочно в

течение трёх дней до введения формалина и через 1 час после. Препаратом сравнения являлся индометацин – известное нестероидное противовоспалительное средство (таблетки 25 мг «Софарма», Болгария) в дозе 5 мг/кг, который так же вводили внутривентриально по аналогичной схеме. Контрольным животным вводили в эквивалентном объёме дистиллированную воду по аналогичной схеме. Экстракт растворяли в 1% крахмальном клейстере, таблетки индометацина растирали в ступке и суспендировали в 1% крахмальном клейстере. Формалиновый отёк вызывали однократным субплантарным введением под апоневроз задней правой лапки мыши 0,05 мл 1% формалина в качестве флогогенного агента. Через три часа, на пике воспаления, животных подвергали эвтаназии в CO₂ камере и регистрировали прирост объёма экссудата ампутированных конечностей мышей (мг). Величину отёка определяли по разнице в массе лапок у контрольных и опытных животных и рассчитывали процент угнетения отёка по формуле:

$$\% \text{ угнетения отёка} = \frac{P_k - P_o}{P_k} \times 100$$

Где P_к – разность масс лапок с отёком и без отёка у животных контрольной группы; P_о - разность масс лапок с отёком и без отёка у животных опытной группы.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (Stat Soft, США). Достоверность различий между группами оценивали по критерию Манна – Уитни.

Результаты и обсуждение

Результаты эксперимента представлены в таблице.

Таблица – Противовоспалительный эффект змееголовника молдавского травы экстракта при трёхдневном введении мышам.

Группы животных	Доза, мг/кг, внутрь	Прирост объема экссудата на пике воспаления, мг	Противовоспалительный эффект %
1. Контроль. 1% крахмальный клейстер	-	155,57±25,37	-
2. Змееголовника молдавского экстракт	10	118,0±11,69	24,1
3. Змееголовника молдавского экстракт	100	102,37±1,9*	34,2
4. Индометацин	5	93,0±1,36*	40,2

Примечание: *- различия статистически достоверны по сравнению с контролем при $p \leq 0,05$.

Как видно из таблицы, экстракт при трёхдневном введении обладал дозозависимым противовоспалительным эффектом. Он уменьшал 1% формалиновый отёк в дозе 10 мг/кг на 24,1% и в дозе 100 мг/кг на 34,2%, по сравнению с контрольной группой животных, но уступал противовоспалительному эффекту индометацина, который уменьшал 1% формалиновый отёк на 40,2%.

Выводы

Змееголовника молдавского травы экстракт сухой под условным названием «Розматин» в дозе 10 мг/кг при трёхдневном введении мышам обладал достоверным противовоспалительным эффектом, подавляя развитие экссудативной фазы воспаления, вызванной 1% формалином, на 24,1%, по сравнению с контрольной группой животных, в дозе 100 мг/кг – на 34,2%.

Экстракт перспективен для дальнейшего углублённого изучения с целью создания препаратов растительного происхождения.

Исполнители:

Научный сотрудник отдела экспериментальной и
клинической фармакологии

Е.Н. Курманова

Научный сотрудник отдела экспериментальной и
клинической фармакологии

Р.К. Курманов

Зав. отделом экспериментальной и клинической
фармакологии ФГБНУ ВИЛАР

Е.В. Ферубко

05.03.2019г.

Подписи Е.Н. Курмановой, Р.К. Курманова и
Е.В. Ферубко ЗАВЕРЯЮ:

Згеный секретарь, к. фарм. н.



Семкина О.А.

Приложение 13. Протокол изучения гастропротективного эффекта «Розматина»

Изучение влияния на состояние слизистой оболочки желудка крыс в условиях острых экспериментальных язв с использованием этаноловой модели змееголовника молдавского экстракта сухого под условным названием «Розматин»

В ФГБНУ ВИЛАР разработан змееголовника молдавского травы экстракт сухой под условным названием «Розматин» (сумма фенольных соединений 65,3% в пересчете на розмариновую кислоту).

Цель: изучение влияния змееголовника молдавского травы экстракта сухого под условным названием «Розматин» на состояние слизистой оболочки желудка крыс в условиях острых экспериментальных язв с использованием этаноловой модели.

Исследуемый объект: змееголовника молдавского травы экстракт сухой под условным названием «Розматин» в дозах 10 мг/кг, 100 мг/кг.

Препарат сравнения: омепразол в дозе 20 мг/кг

Методы исследования

Исследование влияния экстракта змееголовника молдавского на состояние слизистой оболочки желудка крыс в условиях острых экспериментальных язв проводили с использованием этаноловой модели. В качестве препарата сравнения использовали лекарственный препарат омепразол в дозе 20 мг/кг. Экспериментальную работу выполняли на 32 нелинейных белых крысах-самцах. Эксперименты проведены в соответствии с правилами лабораторной практики (GLP), приказом МЗ РФ №199 от 2016 г. «Об утверждении правил лабораторной практики», «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (Москва, 2012). Исследования одобрены Биоэтической комиссией ФГБНУ ВИЛАР. Производитель животных – Филиал «Андреевка» ФГБУН «НЦБТ» ФМБА России (Московская область). Животные содержались в виварии ФГБНУ ВИЛАР на стандартном рационе. Фармакологические свойства экстракта изучали при его внутрижелудочном введении крысам в течение трех дней в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг. Омепразол вводили также в течение трех дней.

Для воспроизведения патологического состояния слизистой оболочки желудка использовали однократное введение крысам этилового спирта 95-96 % в дозе 1,0 мл/крысу с последующей этаназией крыс в CO₂ камере через 1 час после введения этилового спирта.

Все препараты вводили крысам внутривентрикулярно при помощи зонда в утренние часы, за 1 час до кормления в водном растворе. После забоя крыс желудок и двенадцатиперстную кишку извлекали. Желудок (по большой кривизне) и двенадцатиперстную кишку разрезали и промывали в физиологическом растворе. Затем при помощи микроскопа бинокулярного стереоскопического МБС-10 (увеличение 1, миллиметровая шкала) производили подсчет площади язвенных поражений слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки, вычисляли Индекс Паулса (ИП) и терапевтический эффект. Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ статистического анализа, достоверность различий между группами оценивали по критерию Манна – Уитни.

Результаты и их обсуждение

В условиях этаноловой экспериментальной модели язвы желудка при введении экстракта в дозе 10 мг/кг, выявлен гастропротективный эффект – уменьшение площади язвенных дефектов на 89,7 %, ТЭ =9,74 (р <0,05 по сравнению с контролем). При увеличении дозы экстракта до 100 мг/кг площадь язвенных дефектов сокращалась на 93,4%, ТЭ=20,1 (р <0,05 по сравнению с контролем). При введении препарата референта омепразола в дозе 20 мг/кг площадь язвенных дефектов сокращалась на 54,8 %, ТЭ=2,21. Данные эксперимента приведены в таблице.

Таблица

Влияние змееголовника молдавского и омепразола на экспериментальные язвы желудка крыс, вызванные введением этанола

Группа Животных n = 8 (доза, мг/кг)	Крысы с язвами, %	Средняя площадь язвенной поверхности	Индекс Паулса отклонение %	ТЭ
Контроль	100	18,9±2,1	18,9	-
Змееголовник 10 мг/кг	100	1,94 ± 0,8	1,94 89,7	9,74
Змееголовник 100 мг/кг	75	1,25 ± 0,09*	0,94 93,4	20,1
омепразол 20 мг/кг	100	8,54 ± 0,63*	8,54 54,8	2,21

Примечание: * - достоверные отклонения (P<0,05).

Выводы

На экспериментальной модели язвы желудка крыс, вызванной введением этанола, выявлено достоверное дозозависимое гастропротективное действие змееголовника молдавского экстракта сухого под условным названием «Розматин», превышающее гастропротективное действие препарата сравнения омепразола.

Исполнители:

Научный сотрудник отдела экспериментальной и клинической фармакологии

 Е.Н. Курманова

Научный сотрудник отдела экспериментальной и клинической фармакологии

 Р.К. Курманов

Зав. отделом экспериментальной и клинической фармакологии ФГБНУ ВИЛАР
15.06.2020

 Е.В. Ферубко

Подписи Е.Н. Курмановой, Р.К. Курманова и Е.В. Ферубко
заверяю:

Ученый секретарь, к. фарм. наук

 Семкина О.А.

Приложение 14. Протокол изучения фармакологической активности котовника кошачьего и котовника крупноцветкового

Протокол

по изучению фармакологической активности экстрактов из котовника кошачьего и котовника крупноцветкового

В отдел экспериментальной и клинической фармакологии ФГБНУ ВИЛАР на исследование аспирантом ФГБНУ ВИЛАР Звездиной Екатериной Владимировной, выполняющей диссертационную работу по теме: «Фитохимическое исследование некоторых представителей семейства *Lamiaceae*» были переданы образцы котовника кошачьего и котовника крупноцветкового

Профилактика стресса и стресс-индуцированных процессов является важной задачей современной медицины. В настоящее время для профилактики и лечения стресса используются психотропные препараты различных фармакологических групп: адаптогены, седативные средства, анксиолитики (транквилизаторы), антидепрессанты и нейролептики [1,2].

По данным ВОЗ, до 80% населения планеты предпочитают лечиться лекарственными средствами природного растительного происхождения. В связи с чем представляет интерес поиск лекарственных растений, снижающих нервно-эмоциональное напряжение, обладающих низкой токсичностью и не уступающих по выраженности фармакологического эффекта современным синтетическим препаратам. Перспективными источниками биологически активных веществ (БАВ), обладающих нейротропной активностью, являются представители рода *Nepeta* L. – котовник кошачий (*Nepeta cataria* L.) и котовник крупноцветковый (*Nepeta*

grandiflora Bieb.). Известно, что непетолактоны, содержащиеся в эфирном масле из травы этих растений, обладают анксиолитической и седативной активностью [3].

Целью данного исследования явилось изучение фармакологической активности экстрактов и фракций БАВ котовника кошачьего и котовника крупноцветкового с применением специфических ферментных биотест-систем в условиях опытов *in vitro* и с использованием биологических моделей на лабораторных животных для создания новых эффективных лекарственных растительных препаратов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объекты исследования: сухие очищенные экстракты котовника кошачьего (СЭКК) и котовника крупноцветкового (СЭККр), бутанольные фракции котовника кошачьего (БФККр) и котовника крупноцветкового (БФККр), полученные сотрудниками Центра химии и фармацевтической технологии ФГБНУ ВИЛАР. Препаратом сравнения выбран пустырника экстракт (ООО «ВИФИТЕХ»).

Скрининг дофаминергической активности объектов исследования проводили с использованием специфической тирозингидроксилазной (ТГ) биотест-системы *in vitro*. L-тирозин, 3-окси-6-метил-2-этил-пиридина гидрохлорид, 6,7-диметил-5,6,7,8-тетрагидроптерин – реактивы фирмы «Merck KGaA» (Германия). Тирозингидроксилазу получали из гомогената

лейкоцитов крови кроликов породы «Шиншилла», содержащихся в стандартных условиях вивария ФГБНУ ВИЛАР.

Прямой спектрофотометрический метод определения скорости ТГ реакции основан на измерении прироста поглощения для 335 нм [4]. Для сравнительной оценки непосредственного действия образцов на протекание ТГ реакции использовали данные скоростей реакций, полученные при оптимальных концентрациях изучаемых веществ (3,3 и 6,6 мкг/мл).

Фармакологические исследования выполнялись согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01.04.2016, Национальный стандарт Российской Федерации ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики», «Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (2012 г.) и в соответствии с Федеральными законами от 12.04.2010 г. № 61-ФЗ (ред. от 28.11.2018 г.) «Об обращении лекарственных средств». Исследования одобрены биоэтической комиссией ФГБНУ ВИЛАР (протоколы № 19, № 24 от 07.10.2019 г. и от 20.01.20 г.).

Определение параметров острой токсичности проведено по методу Кербера [5]. В эксперименте использованы белые нелинейные мыши в количестве 54 особи обоего пола, массой 20-22 г, в группах по 6 животных (8 опытных групп и 1 контрольная). Экстракты вводили животным внутрижелудочно в дозах 200 мг/кг, 500 мг/кг, 1000 мг/кг, 1500 мг/кг, 2000

мг/кг. Экстракт котовника кошачьего и экстракт котовника крупноцветкового растворяли в воде очищенной. Контрольной группе животных вводили внутривентрально воду очищенную в эквивалентном объёме. Длительность наблюдения за лабораторными животными составила 14 суток. В ходе эксперимента проведено наблюдение за поведением мышей, внешним видом, двигательной активностью, реакцией на внешние раздражители.

Изучение влияния курсового (3-4 дня) введения экстрактов котовника кошачьего и котовника крупноцветкового на моделях «приподнятый крестообразный лабиринт» и «хлоралгидратный сон» [6] проводили на белых нелинейных мышах массой 18,0 – 22,0 г в количестве 48 особей.

Подопытные животные были разделены на 6 групп по 8 особей: первая – контрольные животные. Животные, которые получали экстракт котовника кошачьего в дозе 10 мг/кг – вторая группа, 100 мг/кг – третья. Животные, которые получали экстракт котовника крупноцветкового в дозе 10 мг/кг – четвёртая группа, 100 мг/кг – пятая группа. Животные, которые получали препарат сравнения в дозе 100 мг/кг – шестая группа. Экстракт котовника кошачьего и экстракт котовника крупноцветкового растворяли в воде очищенной. Экстракт пустырника суспендировали в 1% крахмальной взвеси. Контрольной группе животных вводили внутривентрально воду очищенную. На 3 день эксперимента через 30 минут после введения препаратов было изучено влияние экстракта котовника кошачьего и

экстракта котовника крупноцветкового на поведение мышей в условиях модели «крестообразного приподнятого лабиринта» с открытыми и замкнутыми коридорами. Эксперимент проводили по общепринятой методике: животных помещали в центр лабиринта и в течение трёх минут наблюдали за их передвижениями. Анксиолитический эффект подтверждался более длительным пребыванием животных на открытой доске лабиринта, по сравнению с контролем.

На 4 день эксперимента через 30 минут после введения препаратов и 1% крахмального клейстера было изучено снотворное действие экстракта котовника кошачьего и экстракта котовника крупноцветкового с использованием хлоралгидрата в качестве снотворного анализатора. Хлоралгидрат в дозе 350 мг/кг вводили мышам после внутрижелудочного введения исследуемых экстрактов. Время засыпания отмечено по боковому положению животных. Время пробуждения отмечено по принятию животными обычной позы при открытых глазах и груминге. Период наблюдения продолжительности сна – 4 часа.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием пакета программ статистического анализа Statistica 10,0 (StatSoft, США). Для оценки значимости отличий между выборками с распределением, приближающимся к нормальному, использовался t-критерий Стьюдента. Критический уровень значимости P при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05. Данные в тексте и таблице 2 представлены в виде

$M \pm m$. Где M - средняя арифметическая величина, m - ошибка средней арифметической [7].

Работа выполнена в соответствии с планом НИР, шифр 0576-2019-0009 «Проведение доклинических исследований отдельных фракций, субстанций и лекарственных препаратов из лекарственного растительного сырья».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЯ

Для скрининга БАВ из лекарственного растительного сырья целесообразно применение специфических ферментных биотест-систем в условиях опытов *in vitro*. Тирозингидроксилазный тест *in vitro* [7] позволяет специфически выявлять вещества, обладающие непосредственным сродством к дофаминэргической нейромедиаторной системе. Это обусловлено тем, что в тирозингидроксилазе и дофаминовых рецепторах имеются одинаковые места «узнавания», обеспечивающие избирательное связывание со специфическими лигандами. Поэтому тирозингидроксилаза может использоваться в качестве модели «узнающих» сайтов дофаминовых рецепторов для выявления БАВ с указанной активностью. Используемая в данной работе ферментная биотест-система входит в состав Уникальной научной установки ФГБНУ ВИЛАР «Биологические коллекции специфических ферментных биотест-систем *in vitro* (БК-СФБТС)».

Результаты определения прямого влияния образцов на скорость ТГ и реакций *in vitro* представлены в таблице 1. Для удобства оценки влияния

веществ на активность ферментов в условиях опытов *in vitro* результаты представлены в процентах от контроля.

Таблица 1.

Влияние объектов исследования в сравнении с дофамином на скорость тирозингидроксилазной реакции *in vitro*

Объект исследования / концентрации		Тирозингидроксилазная СФБТС	
		мкмоль/мин на мг белка	%
Контроль	-	11,9±0,49	100
СЭКК	3,3 мкг/мл	9,5±0,50*	80
	6,6 мкг/мл	7,7±0,40*	65
БФКК	3,3 мкг/мл	12,3±0,55	103
	6,6 мкг/мл	12,2±0,65	103
СЭККр	3,3 мкг/мл	8,3±0,47*	70
	6,6 мкг/мл	9,5±0,45*	80
БФККр	3,3 мкг/мл	9,5±0,43*	80
	6,6 мкг/мл	9,4±0,45*	79
Пустырник	3,3 мкг/мл	7,1±0,34*	60
	6,6 мкг/мл	7,0±0,33*	59

Примечание: * - статистическая значимость отличий от контроля при $P \leq 0,05$.

Из результатов, представленных в таблице 1, следует, что образец бутанольной фракции котовника кошачьего не оказывал достоверного действия на активность тирозингидроксилазы, что может быть связано с высоким содержанием спирта в образце. Остальные образцы в концентрациях 3,3 и 6,6 мкг/мл оказывали непосредственное достоверное угнетающее влияние на активность ТГ реакции, сравнимое с действием экстракта пустырника. Так как ТГ является частью дофаминовой нейромедиаторной системы, средство БАВ, содержащихся в исследуемых экстрактах котовников и пустырника к этому ферменту, указывает на существенную роль дофаминовой нейромедиаторной системы в молекулярном механизме действия этих соединений. Сильнее всего ингибировали скорость ТГ реакции экстракт пустырника в обеих концентрациях и котовника кошачьего экстракт сухой в концентрации 6,6 мкг/мл, что свидетельствует об их дофаминергических свойствах.

При изучении острой токсичности экстракты котовника кошачьего и котовника крупноцветкового гибели животных во всех группах не вызвали, изменение внешнего вида и поведенческих реакций мышей не наблюдалось. Так как гибели животных в течение всего периода наблюдения отмечено не было, не удалось установить LD_{50} исследуемых экстрактов. Таким образом, по результатам изучения острой токсичности очищенный экстракт котовника кошачьего и сухой очищенный экстракт котовника крупноцветкового относятся к малотоксичным веществам, в соответствии с

классификацией токсичности химических веществ по ГОСТу 12.1.007-76 [8].

Для данных образцов мы изучали влияние курсового (3-4 дня) введения экстракта котовника кошачьего и котовника крупноцветкового на моделях «приподнятый крестообразный лабиринт» и «хлоралгидратный сон» у мышей.

Результаты экспериментов на моделях «приподнятый крестообразный лабиринт» и «хлоралгидратный сон» представлены в таблицах 2 и 3.

Таблица 2.

Изучение влияния котовника крупноцветкового и котовника кошачьего на поведение мышей на модели «крестообразный приподнятый лабиринт»

Вариант опыта N=8	Время на открытой доске, сек., (M ± m)
Контроль	17,5±2,36
СЭККр 10 мг/кг	31,6±1,29*
СЭККр 100 мг/кг	31,3±2,18*
СЭКК 10 мг/кг	28,4±4,02
СЭКК 100 мг/кг	36,5±3,98*
Пустырник 100 мг/кг	40,0±1,30*

Примечание: * - отличия от контроля достоверны при $P \leq 0,05$.

По результатам проведенного эксперимента установлено, что изучаемый экстракт котовника кошачьего в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг удлиняет время пребывания животных на открытой доске по сравнению с контролем в 1,62 и 2 раза, проявляя, таким образом, достоверно выраженный противотревожный эффект.

Экстракт котовника крупноцветкового в дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг удлиняет время пребывания животных на открытой доске по сравнению с контролем в 1,8 раза и также оказывает достоверно выраженный противотревожный эффект.

Препарат сравнения экстракт пустырника в дозе 100 мг/кг удлиняет время пребывания животных на открытой доске в 2,3 раза по сравнению с контролем, т.е. установлено достоверно выраженное противотревожное действие.

Таблица 3.

Влияние котовника крупноцветкового и котовника кошачьего на параметры сна, вызванного хлоралгидратом

№	Вариант опыта N=8	Время латентного периода (мин)	Время сна (мин)
1	Контроль	5,4±2,5	112,7±28,19
2	СЭКК 10мг/кг	2,3±0,05*	143,0±2,07*
3	СЭКК 100мг/кг	2,5±0,03*	132,0±16,20*
4	СЭККр 10 мг/кг	2,4±0,08*	142,8±1,06*

5	СЭККр 100 мг/кг	1,9±0,04*	140,1±3,79*
6	Пустырник 100 мг/кг	2,1±0,07*	145,0±12,51*

Примечание: * - отличия от контроля достоверны при $P \leq 0,05$.

По результатам проведенных экспериментов установлено, что изучаемый экстракт котовника кошачьего в исследуемых дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг вызывает достоверно выраженное сокращение латентного периода сна, достоверно облегчает засыпание в 2,3 и 2,15 раза по сравнению с контролем. Экстракт в исследуемых дозах достоверно увеличивает продолжительность сна на 27 % и 17% соответственно, по сравнению с контролем; оказывает достоверно выраженное седативное действие.

Экстракт котовника крупноцветкового в исследуемых дозах 10 мг/кг и 100 мг/кг также вызывает достоверно выраженное сокращение латентного периода сна, достоверно облегчает засыпание в 2,26 и 2,7 раза по сравнению с контролем. СЭККр в исследуемых дозах достоверно увеличивает продолжительность сна на 26,7% и 24,3% соответственно, по сравнению с контролем; оказывает достоверно выраженное седативное действие.

Препарат сравнения экстракт пустырника в дозе 100 мг/кг вызывает достоверно выраженное сокращение латентного периода сна, достоверно облегчает засыпание в 2,6 раза по сравнению с контролем, достоверно увеличивает продолжительность сна на 28,6% по сравнению с контролем, оказывает достоверно выраженное седативное действие.

Таким образом, в результате первичного биологического скрининга с применением тирозингидроксилазной специфической ферментной биотест-системы в условиях опытов *in vitro* было установлено, что наибольшей нейромедиаторной активностью обладали сухие очищенные экстракты котовника кошачьего и котовника крупноцветкового по сравнению с бутанольными фракциями указанного растительного сырья. При дальнейшем изучении данных экстрактов с помощью фармакологических методов на животных было доказано их седативное и противотревожное действие. Сухие очищенные экстракты котовника кошачьего и котовника крупноцветкового малотоксичны и перспективны для дальнейшего изучения и создания на их основе современных растительных лекарственных препаратов, снижающих нервно-эмоциональное напряжение.

ВЫВОДЫ

1. В результате проведенных скрининговых исследований в условиях опытов *in vitro* на основе тирозингидроксилазы была выявлена дофаминергическая активность у котовника крупноцветкового экстракта сухого и котовника кошачьего экстракта сухого. Эффект данных образцов был сопоставим с препаратом сравнения.
2. В результате проведенных фармакологических исследований в условиях опытов *in vivo* на лабораторных животных установлено, что

экстракты котовника кошачьего и котовника крупноцветкового оказывают достоверно выраженное седативное и противотревожное действие

3. Экстракты котовника кошачьего и котовника крупноцветкового по результатам проведенных исследований перспективны для создания новых эффективных лекарственных растительных препаратов.

Список литературы:

1. Аляутдин, Р.Н. Фармакология / Р.Н. Аляутдин – М.: ГЭО-ТАР. МЕДИА. – 2008. – 832 с.
2. Аляутдин, Р.Н. Стресс-протекторная фитотерапия / Р.Н. Аляутдин, М.Д. Гусейнов, И.Н. Зильфикаров, Б.К. Романов // Биомедицина. – 2011. – №3. – С. 115-119.
3. Aydin, S. Nepetalactone: a new opioid analgesic from *Nepeta caesarea* Boiss. / S. Aydin, R. Beis, Y. Ozturk, K.H. Baser // *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. – 1998. – Vol. 50. – P. 813-817.
4. Минеева-Вялых, М.Ф. Метод прямого спектрофотометрического определения скорости тирозингидроксилазной реакции / М.Ф. Минеева-Вялых // *Вопросы медицинской химии*. – 1976. – Т. 22 (2). – С. 274-279.
5. Беленький, М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта / М.Л. Беленький – Ленинград: Медгиз. – 1963. – 146 с.
6. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

7. Боровиков, В.П. Популярное введение в современный анализ данных в системе STATISTICA / В.П. Боровиков. – М.: Горячая линия. Телеком, 2014. – 288 с.
8. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения // Хим.-фарм. журн. – 2003. – т. 37 – №3. – С.32-34.

Исполнители:

Н. сотр. отделом экспериментальной
и клинической фармакологии



Мартынчик И.А.

Зав. отделом экспериментальной
и клинической фармакологии,
к.мед.н



Ферубко Е.В.

Зам. Рук. Центра медицины
ФГБНУ ВИЛАР, к.б.н.



Лупанова И.А.

Подписи заявителей заверяю
Ученый секретарь ФГБНУ ВИЛАР,
К.фарм. н.



Семкина О.А.

Дата 26.11.2019



Приложение 15. Протокол исследования противовоспалительной активности экстрактов котовника кошачьего и котовника крупноцветкового

Протокол исследования противовоспалительной активности экстрактов котовника крупноцветкового и котовника кошачьего с применением биотест-системы на основе индуцибельной NO-синтазы в условиях *in vitro*.

Проведены скрининговые исследования противовоспалительной активности в условиях *in vitro* из экстрактов котовника крупноцветкового и котовника кошачьего с применением ферментной биотест-системы, разработанной на основе индуцибельной NO-синтазы (iNOS), согласно утвержденной методики.

Для выявления противовоспалительной активности БАВ в экстрактах и фракциях, полученных из лекарственных растений, в ФГБНУ ВИЛАР была разработана и верифицирована ферментная биотест-система на основе индуцибельной NO-синтазы, которая относится к лимитирующим ферментам, экспрессируемым при инфекционно-воспалительных заболеваниях под действием инфицирующего фактора и цитокинов в клетках макрофагов, нейтрофилах, гепатоцитах, мезангиальных, гладкомышечных клетках, хондроцитах и синовиоцитах [3]. Индуцибельная NO-синтаза играет важную роль в защите организма от инфицирующего агента, так как продуцирует активный радикал оксида азота (NO^{*}), который участвует в регуляции иммунитета, сосудистого тонуса, обеспечивает антимикробную и противоопухолевую защиту. Известно, что лекарственные препараты, обладающие иммуностимулирующими свойствами активируют макрофаги и увеличивают синтез индуцибельной NO-синтазы [1].

Эффективность противовоспалительного действия БАВ, содержащихся в экстрактах оценивали по скорости ферментативной реакции, катализируемой индуцибельной NO-синтазой, являющейся маркером развития воспалительного процесса в организме [2].

Для исследования противовоспалительной активности в ФГБНУ ВИЛАР отдела экспериментальной и клинической фармакологии для скрининга поступили образцы для исследования:

1. Образец № 1 – сухой очищенный экстракт котовника крупноцветкового;
2. Образец № 2 – сухой очищенный экстракт котовника кошачьего;
3. кошачьего;
4. Образец № 3 –бутанольная фракция котовника кошачьего;
5. Образец № 4 –бутанольная фракция котовника крупноцветкового;
6. Образец № 5- экстракт пустырника.

Методика исследований

Метод определения противовоспалительной активности биотест-системы на основе iNOS *in vitro*.

Активность фермента iNOS в экспериментах оценивали по скорости реакции, катализируемой iNOS *in vitro* при 37°C. Реакционная проба содержала буферный раствор 50 мМ HEPES pH 7,4 с 1 мМ ацетатом магния, ДМТП, ДТТ в концентрациях, указанных в работе, фермент iNOS в оптимальной концентрации - 1,4 мкг/мл, субстрат- 0,5 мМ раствор L-аргинина, раствор НАДФН в концентрации 0,1 мМ. Раствор исследуемых экстрактов котовника и пустырника готовили в концентрации 0,00334г в 2 мл деионизованной воды. Скорость iNOS-реакции определяли при 340 нм в кинетическом режиме по оптической плотности раствора в процессе синтеза оксида азота (NO) из субстрата аргинин с участием НАДФН. Скорость iNOS-реакции до (контроль) и после добавления тестируемого вещества (опыт) определяли по изменению поглощения НАДФН в процессе iNOS-реакции на двухлучевом спектрофотометре марки «Шимадзу UV-1800» (Япония), используя программу «Кинетические исследования». Кинетическую скорость ферментативной реакции, катализируемой iNOS *in vitro*, рассчитывали до (контроль) и после (опыт) добавления в пробу исследуемого экстракта, используя молярный коэффициент экстинкции, равный 6,22 мМ⁻¹. Результаты обрабатывали статистически. Данные в таблицах представлены в виде $M \pm m$, где M – средняя арифметическая величина, m- средняя квадратичная ошибка.

Результаты и их обсуждение

В таблице 1 представлены результаты изменения скорости ферментативной iNOS-реакции *in vitro* под влиянием БАВ экстрактов котовника и пустырника, содержащихся в исследуемых образцах.

Таблица 1 – Влияние БАВ на скорость ферментативной реакции, катализируемую iNOS в условиях опытов *in vitro*.

Варианты опытов	Скорость ферментативной реакции, катализируемая iNOS <i>in vitro</i>	
	мкмоль НАДФН/ мг белка в мин. (M ± m)	Опыт/ контроль (%)
Контроль (без препарата)	1,8 ± 0,018	100
Образец №1 сухой очищенный экстракт котовника крупноцветкового	1,4 ± 0,026	78
Образец №2 сухой очищенный экстракт котовника кошачьего	1,54 ± 0,022	85,5
Образец №3 бутанольная фракция котовника кошачьего	2,2 ± 0,028	123
Образец №4 бутанольная фракция котовника крупноцветкового	2,2 ± 0,020	123
Образец №5 экстракт пустырника	1,4 ± 0,12	78

Примечание –* – статистическая значимость отличий от контроля при $p < 0,05$

Из результатов, представленных в таблице 1, следует, что в экспериментах *in vitro* образцы: сухой очищенный экстракт котовника крупноцветкового; сухой очищенный экстракт котовника кошачьего; экстракт пустырника снижают скорость ферментативной реакции индуцибельной NO-синтазы, что может свидетельствовать о наличии противовоспалительной активности в данных образцах.

Заключение

В результате проведенных скрининговых исследований в условиях *in vitro* на основе индуцибельной NO-синтазы была выявлена

противовоспалительная активность у сухого очищенного экстракта котовника крупноцветкового; сухого очищенного экстракта котовника кошачьего; экстракта пустырника (как препарата сравнения). Данные опытные образцы рекомендованы для дальнейшего углубленного изучения.

Литература

1. Дубинская В.А., Володина Т.В. Ферментные тест-системы in vitro для первичного скрининга биологически активных веществ// Качество и жизнь 2016 № 1 с.67-69
2. Кондакова Н.В., Стрелкова Л.Б., Дубинская В.А., Быков В.А. Ксантиноксидаза как ферментная биотест-система для выявления in vitro биологически активных веществ с противовоспалительными и противоартритными свойствами. // Вопр. биол., мед. и фарм. химии. 2013. – № 11. С. 75–80.
3. Стрелкова Л.Б., Кондакова Н.В., Дубинская В.А. Индуцибельная NO-синтаза как фермент биотест-системы для выявления веществ с противовоспалительными свойствами in vitro. // Вопр.биол., мед. и фарм. химии. 2013. – № 11. С. 81–86.

Исполнители:

Н. сотр. отделом экспериментальной
и клинической фармакологии



Мартынчик И.А.

Зав. отделом экспериментальной
и клинической фармакологии,
к.мед.н



Ферубко Е.В.

Зам. Рук. Центра медицины
ФГБНУ ВИЛАР, к.б.н.



Лупанова И.А.

Подписи заявителей заверяю
Ученый секретарь ФГБНУ ВИЛАР,
К.фарм. н.



Семкина О.А.

Дата 26.11.2019



Приложение 16. Лабораторный регламент на производство сухого экстракта

«Розматин»

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

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ ВИЛАР

академик РАН,

доктор сельскохозяйственных наук

Н.И. Сидельников



«19» мая 2021 г.

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

на производство фармацевтической субстанции
«Змееголовника молдавского травы экстракт сухой «Розматин»»
ЛР-04868244-03-2021

Срок действия регламента до «19» мая 2024 г.

СОГЛАСОВАНО

Председатель специализированной секции
Ученого совета ФГБНУ ВИЛАР по поиску
БАВ и разработке лекарственных
растительных препаратов, доктор
фармацевтических наук,
профессор

П.Г. Мизина
«19» мая 2021 г.

Москва-2021