

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ УКРАИНЫ
НАЦИОНАЛЬНЫЙ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
факультет по подготовке иностранных граждан
кафедра фармакогнозии**

КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

по теме: «**ФИТОХИМИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ ЛИСТЬЕВ МОРОШКИ**»

Выполнил: соискатель высшего образования
группы Фм18(5,0д)и-05
специальности 226 Фармация, промышленная фармация
образовательной программы Фармация
Ал Хажж Хассан Зу Эл Фикар

Руководитель: ассистент заведения высшего образования
кафедры фармакогнозии,
к.фарм.н., Николай КОМИССАРЕНКО

Рецензент: профессор заведения высшего образования
кафедры аналитической химии и аналитической
токсикологии,
д.фарм.н., профессор Сергей КОЛЕСНИК

Харьков – 2023 год

АННОТАЦИЯ

Ал Хажж Хассан Зу Эл Фикар. Фитохимическое изучение листьев Морошки

Квалификационная работа посвящена фитохимическому исследованию листьев *Rubus chamaemorus*. Проведен качественный анализ биологически активных веществ листьев *Rubus chamaemorus*. Определено количественное содержание БАВ и спрогнозировано фармакологическое действие средств на листья Морошки обыкновенной.

Ключевые слова: листья Морошки, биологически активные вещества, флавоноиды, летучие вещества.

ANNOTATION

Al Hajj Hassan Zu El Fikar. Phytochemical study of the leaves of *Rubus chamaemorus*

The qualifying work is devoted to the phytochemical study of the leaves of *Rubus chamaemorus*. Qualitative analysis of biologically active substances of *Rubus chamaemorus* leaves was carried out. The quantitative content of BAP has been determined and pharmacological action of remedies on Common Cloudberry leaves has been predicted.

Key words: Cloudberry leaves, biologically active substances, flavonoids, volatile substances.

СОДЕРЖАНИЕ			
ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ			4
ВВЕДЕНИЕ			5
РАЗДЕЛ 1	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.		8
	1.1	Ботаническая характеристика и географическое распространение <i>Rubus. chamaemorus</i> L.	8
	1.2	Основной состав вторичных метаболитов <i>R. chamaemorus</i>	10
	1.3	Биологическая активность и применение <i>R. chamaemorus</i> L.	25
РАЗДЕЛ 2	КОМПЛЕКСНЫЙ ФИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ		30
	2.1	Метод высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ)	31
	2.2	Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодноматричным детектором (ВЭЖХ-УФ)	34
	2.3	Метод газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ГХ-МС)	41
	2.4	Прогноз биологической активности основных вторичных метаболитов листьев <i>Rubus Chamaemorus</i>	46
Общие выводы			55
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ			56
ПРИЛОЖЕНИЯ			

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БАС – биологически активные соединения;

БХ – бумажная хроматография;

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;

ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения;

ГФУ – Государственная фармакопея Украины;

ЛРС – лекарственное растительное сырьё;

НД – нормативная документация;

НФаУ – Национальный фармацевтический университет;

СО – стандартный образец;

ТСХ – тонкослойная хроматография;

УФ – ультрафиолетовый;

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы. Одной из ключевых задач современной фармации является поиск новых перспективных соединений - потенциальных лекарственных кандидатов. Природные объекты, особенно растительные, издавна являются богатыми источниками новых молекул и находят широкое применение в мировой пищевой и фармацевтической промышленности [1]. Химический состав некоторых растений, обладающих полезными свойствами согласно данным этнофармакологии, исследован незначительно или совсем не изучен [2]. Таким образом, выделение, установление структуры и исследование природных соединений, проявляющих высокую степень структурного разнообразия, является неотъемлемой частью современного поиска и разработки новых лекарственных препаратов [3].

Морошка обыкновенная (*Rubus chamaemorus* L.) из семейства Розоцветные (*Rosaceae*) (далее - *R. chamaemorus*) известна широким применением плодов в пищевой промышленности. В северных странах Европы, странах Азии и Северной Америки плоды *R. chamaemorus* нашли широкое применение как противогинготное, мочегонное, потогонное и противовоспалительное средство. Листья *R. chamaemorus* применяются как вяжущее, кровоостанавливающее, мочегонное, противовоспалительное и ранозаживляющее средство [4,6].

Плоды *R. chamaemorus* ранее изучались с целью установления содержания в них биологически активных веществ. Было установлено, что основной группой вторичных метаболитов плодов *R. chamaemorus* являются различные полифенолы. Листья *R. chamaemorus* ранее не подвергались фитохимическому исследованию, хотя достаточно широко применяются в народной медицине многих стран [7]. Учитывая, что листья *R. chamaemorus* вносят наибольший вклад в биомассу надземной части растения, их фитохимическое изучение является актуальной задачей. Выделение из листьев *R. chamaemorus* в индивидуальном

виде основных вторичных метаболитов и установление их структуры позволит получить ряд потенциальных фармацевтических субстанций и биологически активных добавок на их основе.

Цель работы – Целью работы является фитохимическое исследование листьев *R. Chamaemorus*.

Задачи исследования.

- исследовать литературные данные о составе биологически активных веществ Морошки обыкновенной, фармакологической активности вытяжек, использование Морошки обыкновенной в народной и официальной медицине;

- провести ГХ-МС анализ первичных метаболитов листьев *R. Chamaemorus*;

- проанализировать профили вторичных метаболитов в различных фракциях вытяжек листьев *R. Chamaemorus* с помощью современных хроматографических методов;

- получить фракции, обогащенные полифенольными соединениями (флаваноиды, фенольные кислоты, танины), проанализировать состав вторичных метаболитов;

- осуществить компьютерный прогноз возможных видов биологической активности отдельных химических компонентов *R. Chamaemorus*.

Объект исследования. фитохимическое исследование листьев *R. Chamaemorus*.

Предмет исследования. Определение качественного состава и количественного содержания основных групп БАВ, компьютерный прогноз возможных видов биологической активности отдельных химических компонентов листьев *R. Chamaemorus*.

Методы исследования: Методология исследования заключалась в использовании комплекса современных физико-химических методов анализа, направленных на всестороннее фитохимическое исследование растительного

материала. Физические - определение потери в массе при высушивании, растворимости; физико-химические - хроматография, спектрофотометрия, химические - реакции идентификации БАВ, гравиметрический; фармакологические; статистические - обработка результатов экспериментов согласно требованиям ГФУ.

Практическое значение полученных результатов. Определен качественный состав и количественное содержание основных групп БАВ листьев *R. Chamaemorus*. Проведен компьютерный прогноз возможных видов биологической активности отдельных химических компонентов.

Элементы научных исследований. Проведенный предварительный фитохимический анализ фракций различной полярности с использованием методов ВЭЖХ-УФ и ВЭТСХ позволил определить мажорные группы вторичных метаболитов. Сравнение качественного состава фракций и содержания БАВ в них позволило выявить фракции, перспективные для дальнейшего фитохимического анализа.

Апробация результатов исследования и публикации. Результаты исследования были представлены на V Международная научно-практическая интернет-конференция "Современные достижения фармацевтической науки в создании и стандартизации лекарственных средств и диетических добавок, содержащих компоненты природного происхождения" (14 апреля 2023 г.) в Национальном фармацевтическом университете (г. Харьков) По результатам квалификационной работы опубликованы 1 тезисы доклада.

Структура и объём квалификационной работы. Работа состоит из введения, аннотации на русском и английском языках, обзора литературы, 2-х разделов собственных исследований, общих выводов, списка использованной литературы, который включает в себя 80 источников, в том числе 65 на иностранных языках, и приложений. Содержание работы изложено на 55 страницах основного текста и иллюстрировано 10 таблицами 11 рисунками.

РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

1.1 Ботаническая характеристика и географическое распространение

Rubus. chamaemorus L.

Морошка обыкновенная - *Rubus chamaemorus L.* представляет собой двудомное многолетнее травянистое растение из семейства розоцветных (*Rosaceae Juss.*). Побеги *R. chamaemorus* как вегетативные, так и генеративные отходят от системы ползучих корневищ, являются прямостоячими и имеют высоту до 25 см. На молодых побегах обычно содержатся от одного до четырех листьев с пластинками длиной 2-5 см и шириной 3-7 см. Листья простые, опушенные, у основания сердцевидные или почковидные, морщинистые, имеют 5-7 зубчатых лопастей. Железистые волоски встречаются в основном на нижней стороне листа и достаточно густо покрывают черешки, имеющие длину 1-7 см. Молодые листья ярко-зеленые, а зрелые темно-зеленые. Цветки одиночные, верхушечные, разнополые. Мужские цветки раскрываются раньше и выделяют обильный нектар, а женские цветки производят его в очень небольших количествах. У мужских цветков, когда венчик опускается, чашечка сохраняется и расправляется, тогда как у женских цветков чашечка окружает молодой плод. Чаще всего, 5 (или более) лепестков имеют длину 8-12 мм., яйцевидную форму, они белые, опушенные и намного больше по размеру в сравнении с чашелистиками. Цветоножка и чашечка покрыты железками. Плод - сборная съедобная костянка, состоит из 4-20 костянок, которые вначале красные, но по мере созревания становятся мягкими и приобретают оранжево-янтарную окраску. Каждая костянка содержит гладкое, твердое семя. Количество костянок зависит как от погодных условий, так и от времени опыления и оплодотворения. Растение размножается главным образом с помощью разветвленных корневищ,

которые достигают до 10 м в длину и произрастают примерно на 10-15 см ниже поверхности земли. Новые надземные побеги развиваются из почек на корневищах. В результате такого вегетативного размножения отдельный клон может занимать площадь в несколько квадратных метров.

R. chamaemorus произрастает исключительно в северном полушарии и имеет циркумполярный ареал (рисунок 1.1). Ареал *R. chamaemorus* распространен на трех континентах. В Северной Америке он простирается от Аляски через Канаду до Гренландии. В Европе встречается в основном в России, Норвегии, Швеции, Финляндии и Шотландии, тогда как в Центральной Европе *R. chamaemorus* встречается редко. В Азии южная граница ареала простирается на восток через Россию, северную Маньчжурию, Монголию и на север Японии.



Рисунок 1.1. Ареал произрастания *R. chamaemorus*

R. chamaemorus населяет в основном торфяные и верховые болота. Эти места обитания, как правило, кислые и бедные питательными веществами. Она также произрастает в тундре, часто обильно растет на участках, покрытых сфагновым мхом. Растения, растущие в разных местообитаниях, проявляют фенотипическую изменчивость. Экземпляры с длинными побегами и крупными листьями встречаются на затененных участках, а с короткими побегами и мелкими листьями - на открытых участках [9,14].

1.2 Основной состав вторичных метаболитов *R. chamaemorus*

Основную группу вторичных метаболитов *R. chamaemorus*, составляют полифенолы. Среди полифенолов, обнаруженных в экстрактах плодов *R. chamaemorus*, можно отметить наличие эллаготаннинов (77,1%),

проантоцианидинов (5,9%), фенолкарбоновых кислот (12,2%), флавоноидов (2,6%) и антоцианов (0,4%) [7]. Стоит также отметить, что состав таннинов *R. chamaemorus* более хорошо изучен в сравнении с составом флавоноидов [15].

Гидролизуемые и конденсированные таннины

Таннины, которые принято подразделять на гидролизуемые и конденсированные, представляют собой достаточно обширную и широко встречаемую группу растительных полифенолов [16]. С точки зрения биосинтеза, эти две группы таннинов не являются родственными и образуются в результате разных биосинтетических путей, но, в конечном итоге, некоторые свойства полученных соединений и их биологическая роль в растениях весьма сходны [17,18].

Конденсированные таннины встречаются намного чаще в растениях нежели гидролизуемые таннины [19-21]. Как раз одной из отличительных особенностей *R. chamaemorus*, что также справедливо и для ряда других представителей рода *Rubus*, является содержание в растении одновременно конденсированных и гидролизуемых таннинов. Причем содержание гидролизуемых таннинов в *R. chamaemorus* на порядок выше, чем конденсированных [22,23].

Структура как гидролизуемых, так и конденсированных таннинов состоит из повторяющихся взаимосвязанных мономерных звеньев [24]. Число мономерных единиц, входящих в состав их структуры, может быть различным. Для конденсированных таннинов степень полимеризации гораздо выше, чем у

гидролизующихся, и почти достигает 70 мономеров. Среди гидролизующихся же таннинов наиболее распространенным олигомером является тетрамер [25,26].

Конденсированные таннины состоят из повторяющихся остатков флаван-3-олов. Большое разнообразие структур конденсированных таннинов достигается за счет вариаций в их степени полимеризации, разновидностью мономерных субъединиц и их стереохимии, характера связи между субъединицами, а также наличия или отсутствия сложноэфирной связи у алифатического гидроксильного в положении 3 кольца С флаванового производного с фенолкарбоновыми кислотами, характера и положения связи между мономерами и степени окисленности и окислительной сшивки мономерных звеньев [27-31]. В плодах *R. chamaemorus* были обнаружены следующие мономерные единицы конденсированных таннинов - (+)эпикатехин и (-)-эпикатехин, а также проциадидин В2, представляющий собой димер (-)-эпикатехина (таблица 1.1).

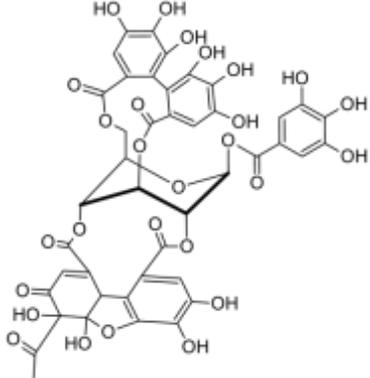
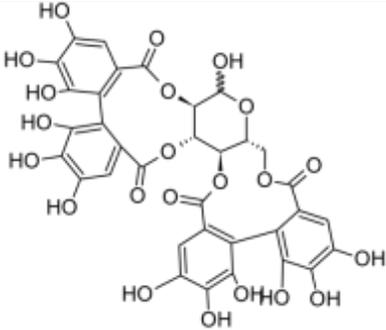
Гидролизующиеся таннины, чаще всего, состоят из циклического полиола, - как правило, глюкозы, гидроксильные группы которой полностью или частично этерифицированы галловой и/или эллаговой кислотой, а также их производными. Структурное разнообразие гидролизующихся таннинов, в пределах сравнимых молекулярных масс, гораздо выше, чем у конденсированных таннинов [32]. Такое высокое разнообразие структур достигается за счет количества и пространственного взаиморасположения этерифицированных гидроксильных групп центрального полиола, типа замещающих кислот, степени олигомеризации, характера связи между мономерами и продуктами окислительного и/или восстановительного изменения/сшивки центральных полиолов и замещающих кислот между собой [33-35]. К гидролизующимся таннинам также относятся метилированные и гликозилированные производные эллаговой кислоты [36-37].

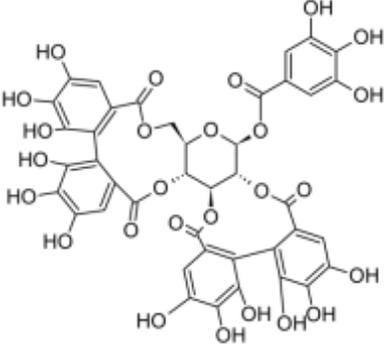
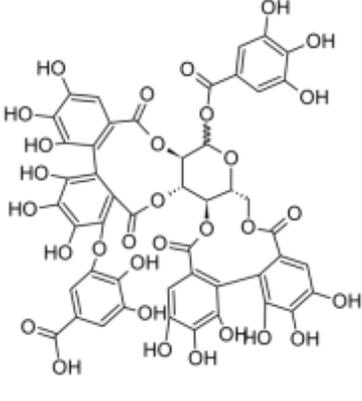
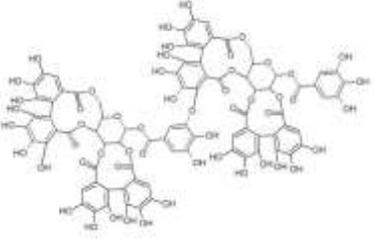
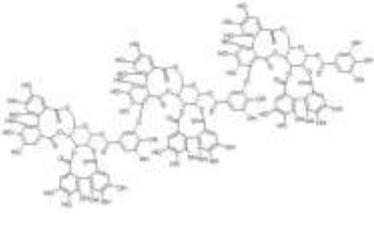
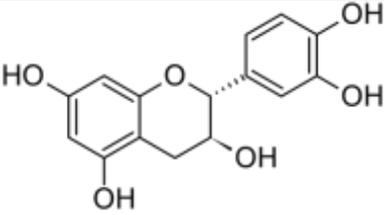
Количественное содержание гидролизующихся таннинов в *R. chamaemorus* крайне велико и преимущественно представлено эллаготаннинами. Методом

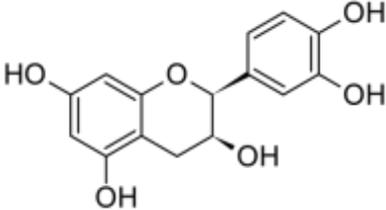
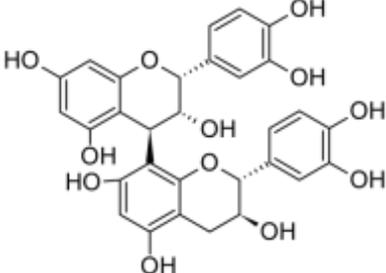
ВЭЖХ-МС в экстракте плодов были обнаружены порядка 26 гидролизуемых танинов, причем возможную структуру авторам исследования удалось предположить только для девяти из них, из которых мономерных эллаготаннинов 6 (Филлантузиин G, Педункулагин/Касуариин, Касуариктин/Потентиллин, Сангуйин Н-2), димерных эллаготаннинов 2 (Сангуйин Н-6, Сангуйин Н-10) и тримерных эллаготаннинов – 1 (Ламбертианин С) (таблица 1.1).

Таблица 1.1.

Конденсированные и гидролизуемые танины в плодах *R. chamaemorus* L.

Структура соединения	Название соединений	Литературный источник
Гидролизуемые танины		
	Филлантузиин G	[7]
	Педункулагин/Касуариин	[7]

	Касуариктин/Потентиллин	[7]
	Сангуйин Н-2	[7]
	Сангуйин Н-6	[7,37]
-	Сангуйин Н-10	[7]
	Ламбертианин С	[7, 38]
Конденсированные танины		
	(+) -Катехин	[39]

	(-)-Эпикатехин	[39]
	Процианидин В2	[39]

Флавоноиды

Флавоноиды представляют собой достаточно хорошо изученную и разнообразную группу полифенольных вторичных метаболитов растений [4044]. В *R. chamaemorus*, у которого полифенолы являются основной группой вторичных метаболитов, известно содержание двух групп флавоноидов - флавонолов и антоцианидинов, а также их гликозидов - флавонол-3-Огликозидов и антоцианов, соответственно.

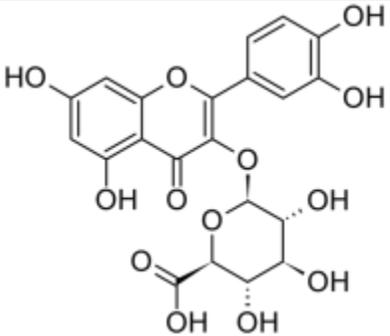
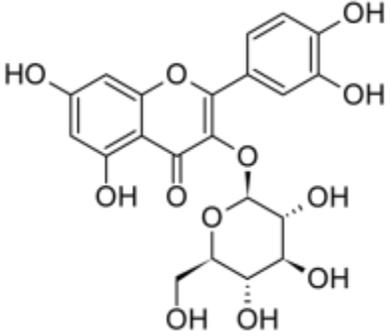
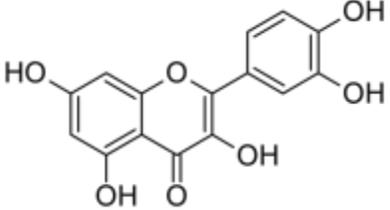
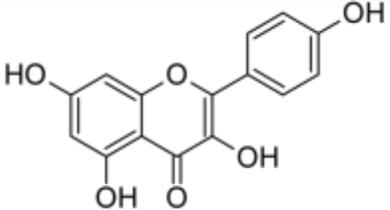
Антоцианы представляют собой ярко окрашенные растительные пигменты, производные замещенных катионов флавилия. Характерной физиологической особенностью антоцианов является резкое колебание их состава в растениях при изменении условий окружающей среды. Так, при понижении температуры окружающей среды и обильных осадках общее количество антоцианов в плодах *R. chamaemorus* увеличивалось, в то время как содержание остальных полифенолов оставались преимущественно неизменным [45].

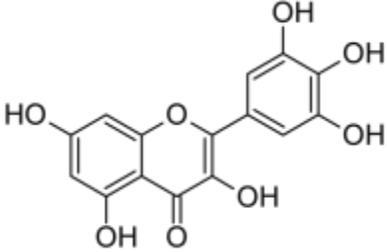
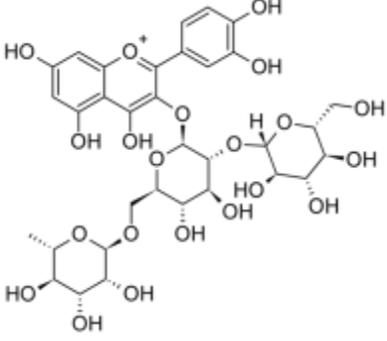
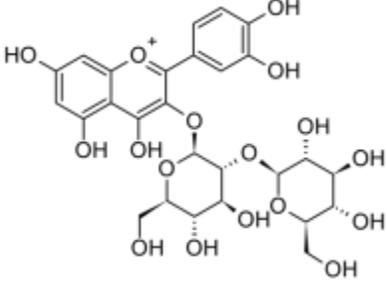
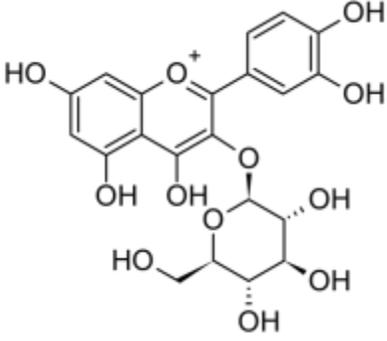
Антоцианы чаще всего встречаются в плодах и лепестках растений [46]. В экстрактах плодов *R. chamaemorus* были обнаружены четыре антоциана, среди которых - один монозид (цианидин-3-О-глюкозид), два биозида (цианидин-3-О-

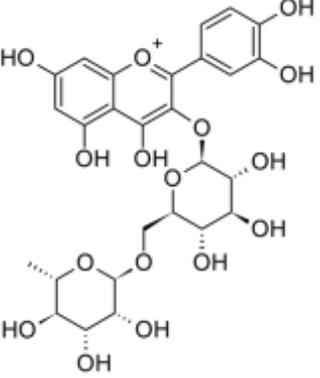
софорозид, цианидин-3-О-рутинозид) и один триозид (цианидин-3-О-(2"-О-глюкозил)рутинозид) (таблица 1.2). Все обнаруженные в *R. chamaemorus* антоцианы в качестве агликона содержали цианидин.

Таблица 1.2.

Флавоноиды и антоцианы в плодах *R. chamaemorus* L.

Структура соединения	Название соединений	Литературный источник
Флавоноиды		
	Кверцетин-3-О-глюкуронид	[38, 39]
	Кверцетин-3-О-глюкозид	[39]
	Кверцетин	[8]
	Кемпферол	[8]

	Мирицетин	[8]
Антоцианы		
	Цианидин-3-О-(2''- Оглюкозил)рутинозид	[39]
	Цианидин-3-О-софорозид	[39]
	Цианидин-3-О-глюкозид	[23]

	Цианидин-3-О-рутинозид	[23]
---	------------------------	------

Флавонолы представляют собой одну из самых распространенных групп флавоноидов, существующих в растениях преимущественно в виде гликозидных производных [47]. В плодах *R. chamaemorus* были обнаружены три флавоноловых агликона – кверцетин, кемпферол и мирицетин (таблица 1.2). Среди гликозидов в данном сырье были обнаружены только производные кверцетина - кверцетин-3-О-глюкозид и кверцетин-3-О-глюкуронид.

Обнаруженный в плодах *R. chamaemorus* кверцетин-3-О-глюкуронид, содержащий остаток глюкуроновой кислоты заслуживает особого внимания. Уроновые кислоты достаточно редко встречаются в гликозидных остатках в сравнении с остальными флавоноидными гликозидами. Особенностью флавоноидных глюкуронидов является их высокая растворимость в водных растворах, что делает очень вероятным их содержание в значимых количествах в пищевой продукции, полученной на основе плодов *R. chamaemorus* наряду с уже известными таннинами.

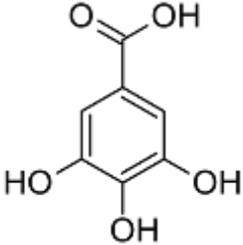
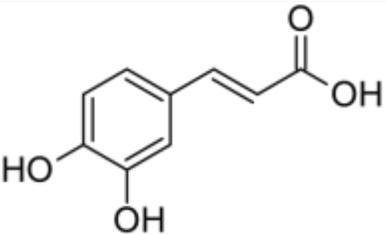
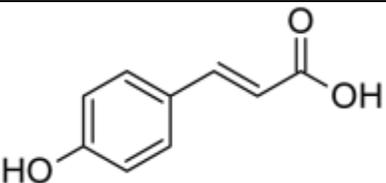
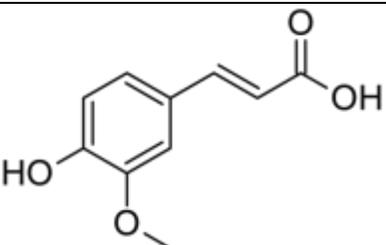
Фенолкарбоновые кислоты

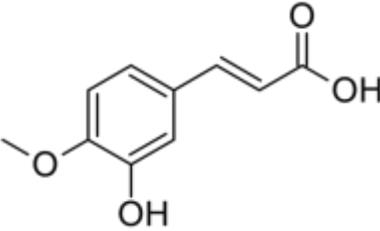
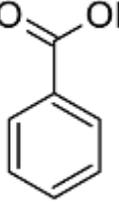
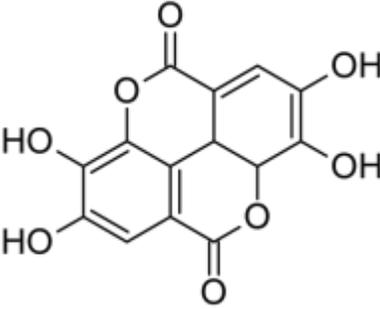
К числу фенолкарбоновых кислот растений принято относить производные как коричных, так и бензойных кислот [48-50]. Коричные кислоты можно считать почти универсальными вторичными метаболитами, так как они являются центральными интермедиатами в биосинтезе огромного числа других групп

соединений включая: флавоноиды, изофлавоноиды, халконы, ауроны, стильбеноиды, лигнаны - почти всех известных фенолпропаноидов. К числу коричневых кислот плодов *R. chamaemorus* относятся: кофейная, п-кумаровая, феруловая и изоферуловая кислоты (таблица 1.3).

Таблица 1.3.

Фенолкарбоновые кислоты в плодах *R. chamaemorus* L.

Структура соединения	Название соединений	Литературный источник
Фенолкарбоновые кислоты		
	Галловая кислота	[39]
	Кофейная кислота	[39]
	п-Кумаровая кислота	[39, 60]
	Феруловая кислота	[39]

	Изоферуловая кислота	[60]
	Бензойная кислота	[39, 60]
	Эллаговая кислота	[7]

Бензойные кислоты плодов *R. chamaemorus* представлены непосредственным родоначальником ряда - бензойной кислотой и её тригидроксипроизводным - галловой кислотой. Галловая кислота, хотя и родственна по структуре бензойной кислоте, образуется в процессе биосинтеза по шикиматному пути, в то время как бензойная кислота образуется уже из фенолкарбоновых кислот через бета-окисление [51,52].

Наличие галловой кислоты в плодах *R. chamaemorus* объясняется обильным содержанием в них гидролизуемых танинов, так как она выступает предшественником в биосинтезе галлотаннинов, из которых в последующем остатки галловой кислоты претерпевают окислительную сшивку между собой образуя эллаготаннины и их производные [53,55]. В плодах *R. chamaemorus* также отмечено большое количество (60 мг на 100 г свежего сырья) свободной эллаговой кислоты, образующейся в результате гидролиза и самопроизвольной

циклизации остатков гексагидроксидифеновой кислоты, входящей в состав эллаготаннинов [56,57].

Свободная бензойная кислота и её производные встречаются во многих растениях [58,59]. Значимые количества бензойной кислоты (0,05%), как правило, содержатся во многих ягодах, выступая в качестве естественных консервантов.

*Состав эфирного масла плодов *R. chamaemorus* L.*

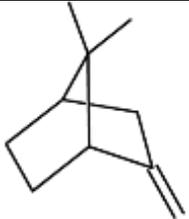
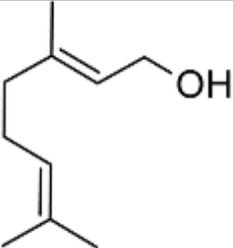
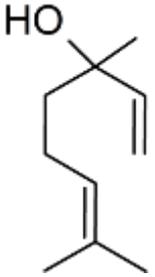
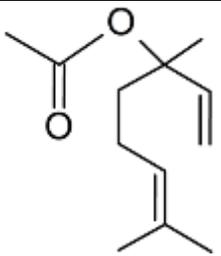
Проводилось исследование состава эфирного масла, полученного из плодов *R. chamaemorus*, в которых было обнаружено более 80 компонентов. В результате исследований ГХ-МС профиля эфирного масла *R. chamaemorus* выяснилось, что оно содержит более 30 ароматических соединений, составляющих примерно 53% состава эфирного масла плодов *R. chamaemorus*. Следует отметить, что большинство из обнаруженных в эфирном масле ароматических соединений в той или иной степени связаны с

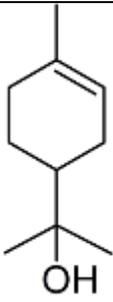
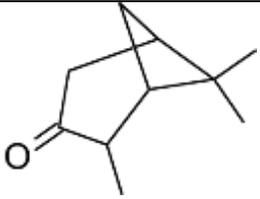
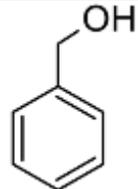
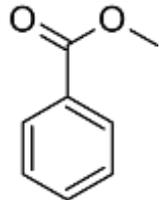
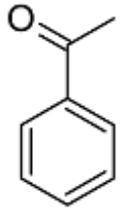
биосинтетическими превращениями бензойной кислоты, которая обнаружена в значительном количестве в плодах *R. chamaemorus*. Мажорными ароматическими соединениями эфирного масла являются: бензиловый спирт (31,3%), метилбензоат (4,5%), ацетофенон (2,9%), 2-фенилэтанол (2,7%), 1-фенилэтанол (2,3%), этилбензоат (2,1%) и 4-винилфенол (1,8%) (таблица 1.4) [60].

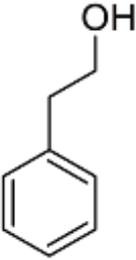
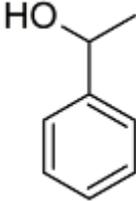
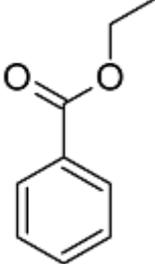
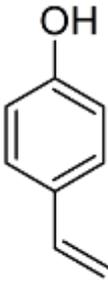
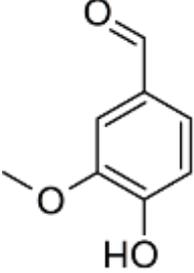
Из соединений терпенового ряда в эфирном масле *R. chamaemorus* были обнаружены: α -фенхен, гераниол, линалоол, линалилацетат, α -терпиниол, изопинокамфон и цис- и транс-линолоолокисды (таблица 1.4). При этом, терпеноиды составляли лишь незначительную часть эфирного масла (около 1,3%) [60,62]. Остальной состав эфирного масла представлен алифатическими кислородсодержащими соединениями (спирты, альдегиды, кетоны, кислоты и сложные эфиры).

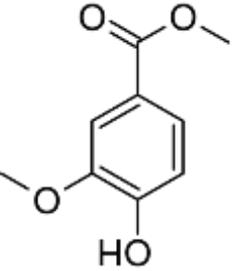
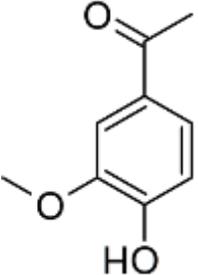
Таблица 1.4.

Основные компоненты эфирного масла *R. chamaemorus* L.

Структура соединения	Название соединений	Литературный источник
Терпеноиды		
	α -Фенхен	[60]
	Гераниол	[60]
	Линалоол	[60]
	Линалил ацетат	[60]

	<p>α-Терпинеол</p>	<p>[60]</p>
	<p>Изопинокамфон</p>	<p>[60]</p>
	<p>цис-, и транс- Линаноол оксид</p>	<p>[60]</p>
<p>Ароматические соединения</p>		
	<p>Бензиловый спирт</p>	<p>[60]</p>
	<p>Метилбензоат</p>	<p>[60]</p>
	<p>Ацетофенон</p>	<p>[60]</p>

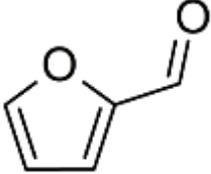
 <chem>OCCc1ccccc1</chem>	2-Фенилэтанол	[60]
 <chem>OC(C)c1ccccc1</chem>	1-Фенилэтанол	[60]
 <chem>CCOC(=O)c1ccccc1</chem>	Этилбензоат	[60]
 <chem>Oc1ccc(C=C)cc1</chem>	4-Винилфенол	[60]
 <chem>COc1cc(O)cc(C=O)o1</chem>	Ванилин	[60]

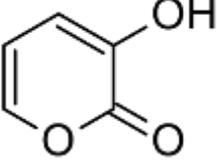
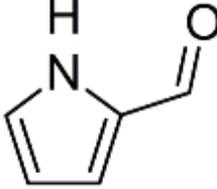
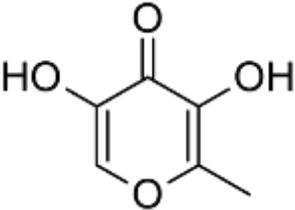
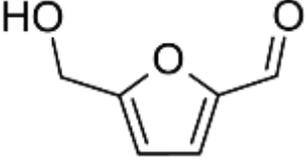
	Метилванилат	[60]
	Ацетованилон	[60]

При дальнейших исследованиях эфирного масла *R. chamaemorus* были обнаружены еще несколько соединений, влияющих на ароматические свойства эфирного масла (ванилин, метилваниллат и ацетованилон), а также новые соединения преимущественно гетероциклической природы (таблица 1.5). Последние, по опубликованным данным, образуются из первоначально обнаруженных соединений в эфирном масле при его нагревании. Эти вторичные продукты, вероятно, влияют на вкус и аромат продуктов *R. chamaemorus*, прошедших термическую обработку [62].

Таблица 1.5.

Соединения, образующиеся после термической обработки плодов *R. chamaemorus* L.

Структура соединения	Название соединений
	Фурфурол

	3-Гидроксипиран-2-он
	2-Пирральдегид
	3,5-Дигидрокси-2-метил-4Н-пиран-4-он
	5-Гидроксиметилфурфурал

1.3 Биологическая активность и применение *R. chamaemorus* L.

В северных странах Европы, Азии и Америки плоды *Rubus chamaemorus* L. нашли широкое применение как противцинготное, мочегонное, потогонное и противовоспалительное средство, листья используются как вяжущее, кровоостанавливающее, мочегонное, противовоспалительное и ранозаживляющее средство [63,65].

Плоды *R. chamaemorus* являются богатым источником витамина С (~ 0.8 мг/г свежих ягод), обладают антимикробной активностью, а также применяются в пищу как источник макро- и микроэлементов, таких как Fe, Cu, Mn, Zn, Mg, K, Ca и P [38, 63]. Финскими учеными было исследовано селективное ингибирующее действие фенольных соединений *R. chamaemorus* и других

ягодных растений (клюква, малина, клубника, черника) в отношении желудочно-кишечных патогенов. Антимикробный эффект наблюдался в отношении *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans* [63] и *Campylobacter jejuni* [66]. Авторы связывают эту активность в отношении данной группы микроорганизмов с наличием в *R. chamaemorus* эллаготаннинов. Активность же в отношении *Salmonella enterica* связывают в основном с присутствием органических кислот – лимонной, яблочной и бензойной [23, 67, 69]. Результаты антимикробной активности экстракта из листьев коррелируют с исследованиями экстрактов из плодов. Антимикробная активность экстракта из листьев наблюдалась в отношении *Staphylococcus aureus* ATCC 9538 и *Staphylococcus epidermidis* TSEC 11047, *Micrococcus luteus* NCTC 8196, *Escherichia coli* NCTC 8196, *Bacillus subtilis* ATCC 6633 и *Candida albicans* ATCC 10231 [18]. С наличием эллаготаннинов также связывают антинеопластическую [63] и ингибирующую активность в отношении кишечных паразитов *Giardia duodenalis* [63, 70]. Отмечалось, что эффективность в отношении кишечных лямблий вызвана также наличием значительного количества неконъюгированной п-кумаровой и бензойных кислот. Полная смертность трофозоитов *Giardia duodenalis* наблюдалась при концентрации полифенолов 66 µg/ml в пересчете на галловую кислоту, что по эффективности сравнимо с применяемым в настоящее время лекарственным препаратом – метронидазолом [70]. Испанскими учеными была установлена амебостатическая активность экстракта из плодов *R. chamaemorus* в отношении патогенных, свободно живущих амёб из рода *Acanthamoeba*, возбудителей гранулематозного амёбного энцефалита, амёбного кератита, амёбного пневмонита и кожных инфекций [63].

Проводился ряд исследований по изучению стабильности фенольных соединений и антибактериальной активности плодов *R. chamaemorus*, которые хранились замороженными в течении года. Было обнаружено уменьшение

содержания гидроксикоричных кислот и флавонолов до 55- 78% и 50-45%, соответственно, от первоначального количества. Содержание эллаготаннинов уменьшилось до 95% от первоначального количества, однако *R. chamaemorus* показала одинаково сильную активность в отношении невирулентной *Salmonella typhimurium* SH-5014 на протяжении всего периода хранения [68].

Изучалось также влияние сухого фракционирования на биологическую активность *R. chamaemorus*. Было проведено сухое фракционирование жмыха плодов *R. chamaemorus*, в результате чего происходило разложение эллаготаннинов, с образованием производных эллаговой кислоты. По данным исследователей, в процессе сухого фракционирования происходит распределение фенольных соединений по фракциям. Так, например, танины концентрировались в тонкой фракции, а флавонолы были обнаружены в основном в грубой фракции. Производные эллаговой кислоты были равномерно распределены между сухими фракциями. Учеными были получены результаты, согласно которым ферментация и сухое фракционирование статистически значимо увеличивали антиадгезионную и противовоспалительную активность *R. chamaemorus*. Мелкая фракция семян показала значительное ингибирование Р-фимбрий-опосредованного анализа гемагглютинации уропатогенной кишечной палочки. Грубая фракция семян значительно снижала продукцию NO и IL-6 и экспрессию iNOS в активированных макрофагах [71].

Проводились также исследования по изучению антиоксидантной активности *R. chamaemorus*. Антиоксидантную активность оценивали методом DPPH [72, 73], а также оценивалась активность экстракта из плодов на живых бактериях, находящихся под воздействием окислительного стресса [23]. В исследованиях на бактериях была продемонстрирована способность экстракта активировать гены Оху-R-регулона и влиять на активность Rpo-S-контролируемой системы общего окислительного стресса, что, как

предполагается, вносит основной вклад в антиоксидантную активность исследуемых экстрактов [74]. А в исследованиях методом DPPH

эллаготаннины плодов показали значительную антиоксидантную активность в отношении окисления эмульсий липопротеина низкой плотности человека и метиллинолеата. Таким образом можно сказать, что эллаготаннины вносят значительный вклад в антиоксидантную активность *R. chamaemorus* [73]. В результате эксперимента на *Drosophilla melanogaster*, было установлено, что добавление экстракта из плодов *R. chamaemorus* в пищу в течении 30 дней увеличивало продолжительность жизни на 11-19% у женских особей, в то время как у мужских особей эффект наблюдался слабо, а в некоторых случаях даже был негативным [75]. Исследователи предполагают, что данный эффект, в той или иной степени, связан с наличием в экстракте β -каротина [75,76].

Следует также отметить, что в питании человека диеты богатые ягодами, оказывают значительную пользу против нескольких типов рака, включая рак толстой кишки. *R. chamaemorus* используют в данных целях, как источник эллаготаннинов с высоким уровнем эллаговой кислоты, обладающей сильной антиканцерогенной, антимуtagenной и антиоксидантной активностью [77,78]. Экстракты, в которых доминируют полифенолы, показали значительную антипролиферативную активность, наблюдалось ингибирование клеточного роста и апоптоз клеток. Введение лиофилизированной *R. chamaemorus* в питание значительно уменьшало количество опухолей и размер кишечных аденом у мышей [77].

Выводы к разделу 1

Основную группу вторичных метаболитов *R. chamaemorus* составляют полифенолы. Среди полифенолов, обнаруженных в экстрактах плодов *R. chamaemorus*, можно отметить наличие элагатанинов (77,1%),

проантоцианидинов (5,9%), фенолкарбоновых кислот (12,2%), флавоноидов (2,6%) и антоцианов (0,4%)

В северных странах Европы, Азии и Америки плоды *Rubus chamaemorus* L. нашли широкое применение как противогинготное, мочегонное, потогонное и противовоспалительное средство, листья используются как вяжущее, кровоостанавливающее, мочегонное, противовоспалительное и ранозаживляющее средство. Плоды *R. chamaemorus* являются богатым источником витамина С, обладают антимикробной активностью, а также применяются в пищу как источник макро- и микроэлементов, таких как Fe, Cu, Mn, Zn, Mg, K, Ca и P.

РАЗДЕЛ 2. КОМПЛЕКСНЫЙ ФИТОХИМИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ И ПРОГНОЗИРОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ

Для определения основных групп вторичных метаболитов, содержащиеся в листьях *R. chamaemorus*, сырье *R. chamaemorus* подвергали многократной экстракции методом мацерации с перемешиванием при комнатной температуре. Для этого, к 700 г высушенного и измельченного растительного сырья прибавляли 5 л 96% этанола (соотношение сырье - экстрагент равно 1:7). Растительное сырье экстрагировали при комнатной температуре с перемешиванием, используя механическую верхнеприводную мешалку (RZR 2021, Heidolf, Германия). По мере насыщения растворителя экстрагируемыми веществами экстракт отфильтровывали и сгущали под вакуумом при 50° до густой консистенции с помощью роторного испарителя (Hei-VAP Advantage, Heidolf, Германия).

Отогнанный растворитель обратно добавлялся в колбу с сырьем и при необходимости уровень растворителя доводился обратно до 5 л свежей порцией 96% этанола. Получаемые порции экстракта после сгущения объединяли. Данную процедуру повторяли многократно до получения слабоокрашенного извлечения.

Сгущенный суммарный этанольный экстракт растворяли в 300 мл метанола. Полученный метанольный раствор подвергали исчерпывающей жидкость-жидкостной экстракции (ЖЖ-экстракции) равными объемами нгексана. Гексановые вытяжки объединяли, сгущали и получили суммарную гексановую фракцию. После ЖЖ-экстракции с н-гексаном к метанольному остатку добавляли 150 мл воды и проводили исчерпывающую ЖЖэкстракцию равными объемами дихлорметана. Полученные дихлорметановые вытяжки объединяли и сгущали, получив суммарную дихлорметановую фракцию. После

ЖЖ-экстракции дихлорметаном, к водно-метанольному остатку добавляли еще 150 мл воды для проведения исчерпывающей ЖЖ-экстракции н-бутанолом. н-Бутанольные вытяжки объединяли и сгущали, получив суммарную н-бутанольную фракцию.

Изначально полученный этанольный экстракт наряду с н-гексановой, дихлорметановой и н-бутанольной фракциями анализировали различными физико-химическими методами анализа - ВЭТХ, ВЭЖХ-УФ и ГХ-МС.

2.1 Метод высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ)

С целью анализа состава основных вторичных метаболитов, содержащиеся в листьях *R. chamaemorus* и поиска наиболее перспективных фракций, из которых можно будет осуществлять их дальнейшее выделение в индивидуальном виде ВЭТСХ-УФ хроматограммы и УФ-спектры всех значимых вторичных метаболитов были зарегистрированы отдельно для н-гексановой, дихлорметановой, н-бутанольной и водной фракции.

Слева направо на линию старта ВЭТСХ пластинки аппликатором поочередно наносилось по 3 мкл н-гексановой, дихлорметановой, н-бутанольной и водной фракции. Затем на эту же пластинку в одинаковом порядке наносились по 7 мкл каждой из этих фракций. Ниже приведены полученные ТСХ хроматограммы при видимом свете (рисунок 2.1), в УФ-свете при 254 нм (рисунок 2.2) и при 366 нм (рисунок 2.3).

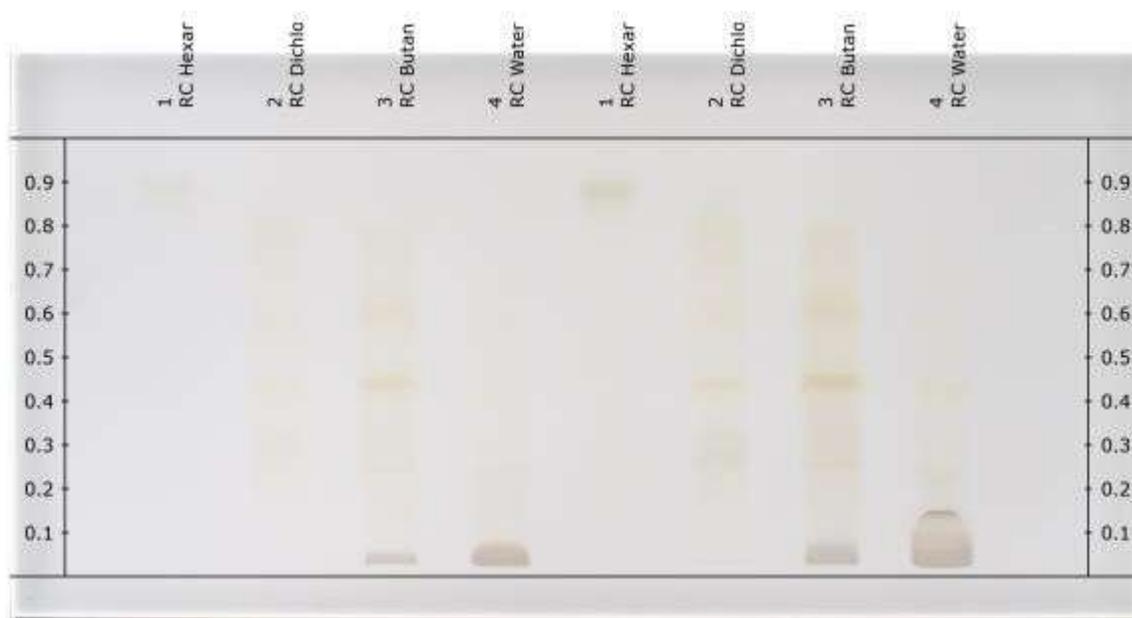


Рисунок 2.1 Вид хроматограммы при видимом свете. Слева направо: нгексановая фракция 3 мкл, дихлорметановая фракция 3 мкл, н-бутанольная фракция 3 мкл, водная фракция 3 мкл, н-гексановая фракция 7 мкл, дихлорметановая фракция 7 мкл, н-бутанольная фракция 7 мкл, водная фракция 7 мкл.

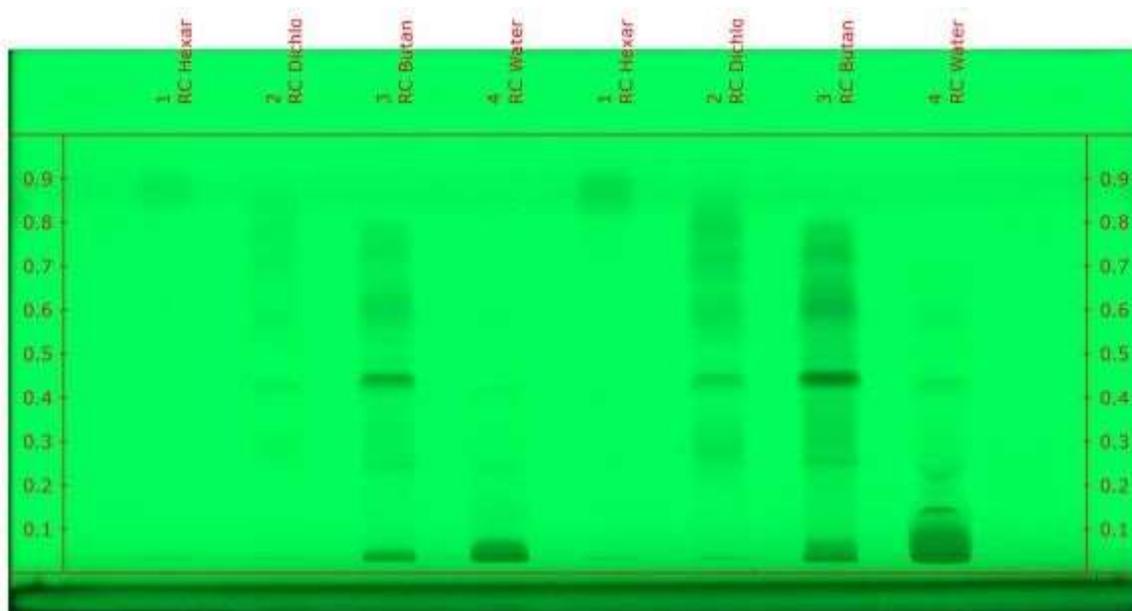


Рисунок 2.2. Вид хроматограммы при 254 нм (обозначения те же, что и на рисунке 2.1).

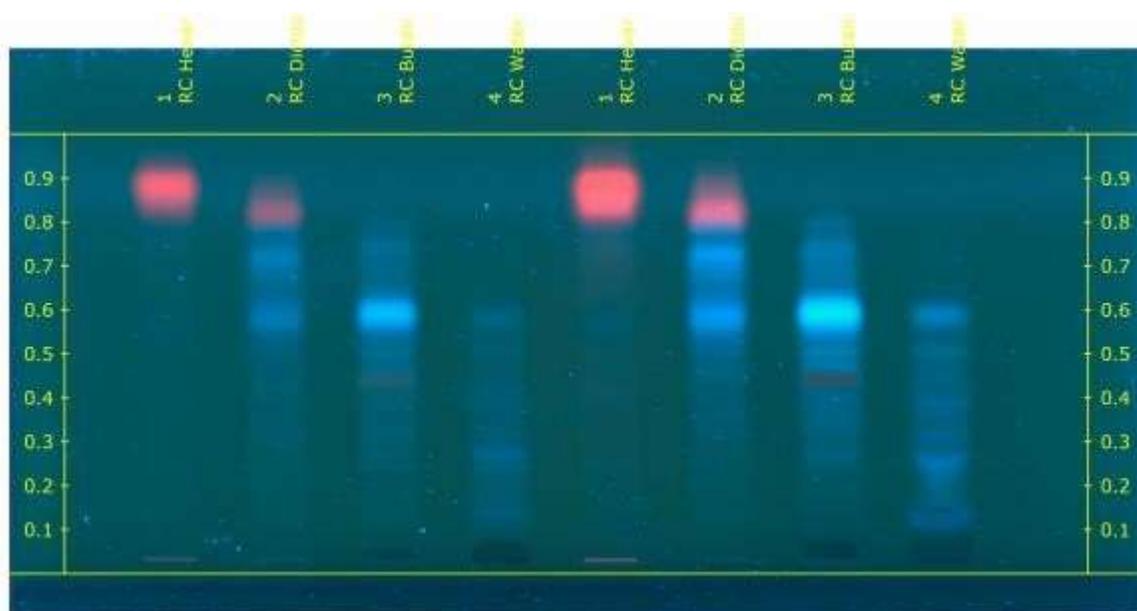


Рисунок 2.3. Вид хроматограммы при 366 нм (обозначения те же, что и на рисунке 2.1).

В н-гексановой фракции (рисунок 2.3) единственной значимой зоной это являлось пятно, имеющая красную флуоресценцию при 366 нм и соответствующее пятнам хлорофилла. Дихлорметановая фракция в диапазоне R_f 0,5-0,8 (рисунок 2.2 и рисунок 2.3) по составу вторичных метаболитов совпадала с аналогичным участком R_f в н-бутанольной фракции. Также, по аналогии с нгексановой фракции заметно наличие пятен хлорофилла в дихлорметановой фракции (рисунок 2.3). н-Бутанольная и водная фракции имеют заметное совпадение качественного состава соединений в диапазоне R_f 0,1-0,6 (рисунок 2.2 и рисунок 2.3), но в каждой фракции наблюдается разное относительное содержание вторичных метаболитов.

В результате анализа ВЭТСХ хроматограмм было установлено, что полярные фракции (н-бутанольная, водная), полученные методом ЖЖэкстракции из этанольного экстракта *R. chamaemorus*, имеют наиболее разнообразный качественный состав и более высокое количественное содержание вторичных метаболитов, что делает их наиболее перспективными для дальнейшего фитохимического изучения.

2.2 Метод высокоэффективной жидкостной хроматографии с диодноматричным детектором (ВЭЖХ-УФ)

С целью более детального анализа состава основных вторичных метаболитов, содержащиеся в листьях *R. chamaemorus* и поиска наиболее перспективных фракций, которые можно использовать в дальнейшем для выделения индивидуальных соединений - ВЭЖХ-УФ хроматограммы и УФспектры всех значимых вторичных метаболитов были зарегистрированы для н-гексановой, дихлорметановой, н-бутанольной и водной фракций.

н-Гексановая фракция (рисунок 2.4) оказалась крайне бедна вторичными метаболитами и дальнейшему фитохимическому анализу не подвергалась. ЖЖ-экстракция с н-гексаном тем не менее оставалась важным этапом при получении остальных подфракций, так как в н-гексановую фракцию переходили липофильные балластные вещества, что было установлено методом ВЭТСХ. Предварительная очистка фракций от липофильных балластных веществ уменьшает загрязнение сорбентов и оборудования, используемых для дальнейшего выделения индивидуальных веществ.

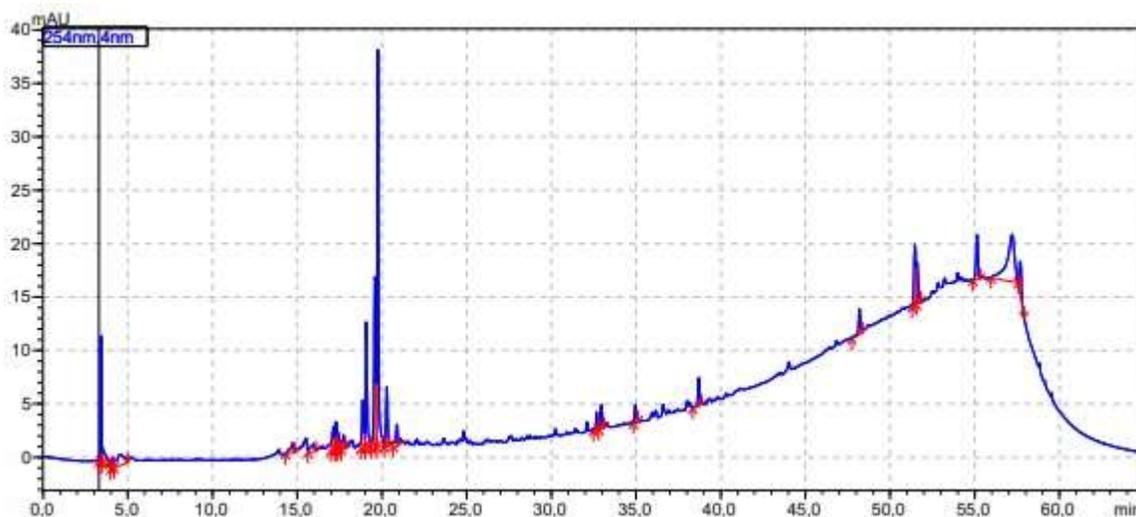


Рисунок 2.4 ВЭЖХ хроматограмма н-гексановой фракции *R. chamaemorus*

Дихлорметановая фракция (рисунок 2.5) содержала часть основных вторичных метаболитов листьев *R. chamaemorus*, но она дальнейшему анализу не

подвергалась по причине значительного совпадения качественного состава основных соединений с соединениями, содержащиеся в н-бутанольной фракции. Также в дихлорметановой фракции были обнаружены остатки липофильных балластных веществ, дальнейшая работа с которыми значительно усложняет процесс выделения индивидуальных соединений.

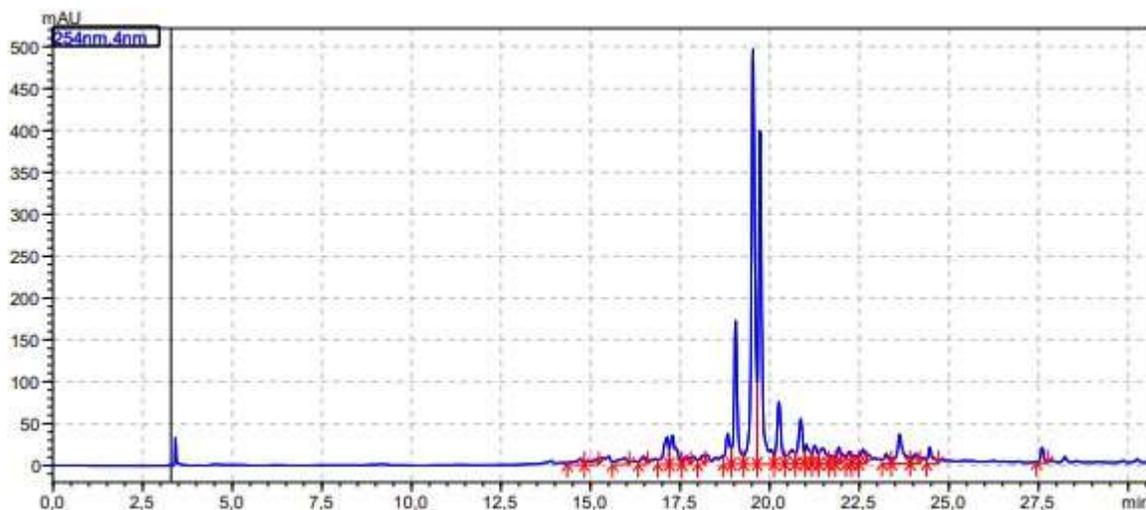


Рисунок 2.5. ВЭЖХ хроматограмма дихлорметановой фракции *R. chamaemorus* н-Бутанольная фракция (рисунок 2.6) содержала значительные количества вторичных метаболитов полифенольной природы. В таблице 6 представлены время удерживания, данные УФ-спектров и предполагаемый класс основных вторичных метаболитов, обнаруженных на хроматограмме.

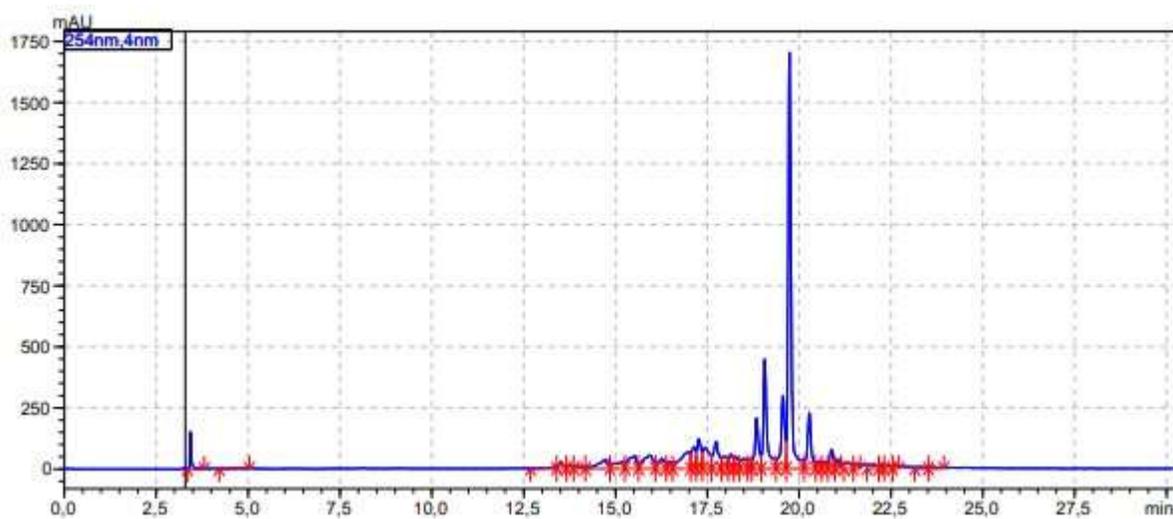


Рисунок 2.6. ВЭЖХ хроматограмма н-бутанольной фракции *R. chamaemorus*

Таблица 2.1.

Характеристики пиков на хроматограмме н-бутанольной фракции листьев *R. chamaemorus*.

Время удерживания, мин	Максимумы поглощения, нм	Класс вторичных метаболитов
13,358	278,8	Конденсированные таннины
13,509	328,4	Фенолкарбоновые кислоты
13,767	285,2; 326,9	Фенолкарбоновые кислоты
13,906	327,2	Фенолкарбоновые кислоты
14,728	324,7	Фенолкарбоновые кислоты
15,208	281,4; 323,4	Фенолкарбоновые кислоты
15,515	324,7	Фенолкарбоновые кислоты
15,938	278,9; 308,8	Конденсированные таннины
16,265	279,0	Конденсированные таннины
16,417	284,1	Конденсированные таннины

16,992	279,4	Конденсированные таннины
17,146	278,5	Конденсированные таннины
17,433	278,5	Конденсированные таннины
17,735	276,2	Конденсированные таннины
17,991	279,0	Конденсированные таннины
18,143	279,3	Конденсированные таннины
18,271	279,3	Конденсированные таннины
18,507	278,6	Конденсированные таннины
18,664	279,1	Конденсированные таннины
18,841	255,2; 348,4; 358,8	Флавонол-3-Огликозиды
19,062	254,5; 349,2; 359,4	Флавонол-3-Огликозиды
19,558	251,5; 366,2	Производные эллаговой кислоты
20,277	254,8; 350,9	Производные эллаговой кислоты
20,562	281,7; 321,3	Фенолкарбоновые кислоты

20,729	282,1	Таннины
20,880	265,8; 285,6; 328,3	Фенолкарбоновые кислоты
21,043	286,4; 327,2	Фенолкарбоновые кислоты
21,268	279,5	Таннины
21,522	280,6	Таннины
21,940	281,9; 321,5	Фенолкарбоновые кислоты
22,235	282,2; 312,2	Фенолкарбоновые кислоты
22,399	280,4	Конденсированные таннины
22,619	283,1; 322,1	Фенолкарбоновые кислоты
23,293	278,6	Конденсированные таннины
23,632	278,4	Конденсированные таннины

Водно-спиртовой остаток (рисунок 2.7) аналогично с н-бутанольной фракцией содержал значительные количества вторичных метаболитов полифенольной природы. Основным характерным отличием водно-

спиртового остатка являлось содержание в нем полифенолов более полярного характера в сравнении с н-бутанольной фракцией. В таблице 2.2 представлены время удерживания, максимумы поглощения и предполагаемый класс основных вторичных метаболитов, обнаруженных на хроматограмме.

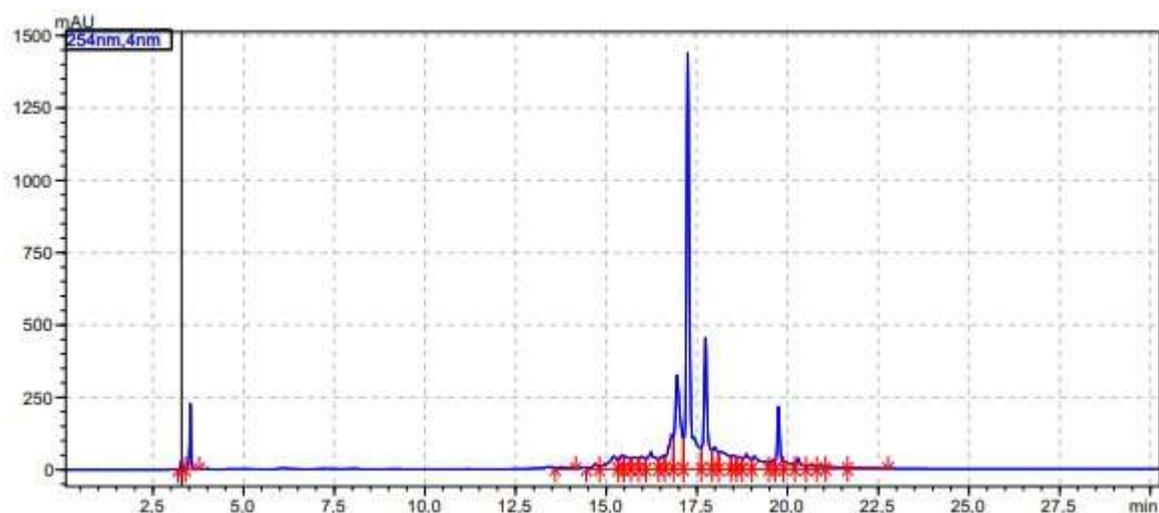


Рисунок 2.7. ВЭЖХ хроматограмма водно-спиртового остатка *R. chamaemorus*

Таблица 2.2

**Характеристики пиков на хроматограмме водно-спиртового остатка
листьев *R. chamaemorus*.**

Время удерживания, мин	Максимумы поглощения, нм	Класс вторичных метаболитов
13,760	327,3	Фенолкарбоновые кислоты
14,708	286,4; 322,3	Фенолкарбоновые кислоты
15,208	270 пл.	Гидролизуемые таннины
15,438	270 пл.	Гидролизуемые таннины
15,526	284,3; 321,1	Фенолкарбоновые кислоты
15,824	274,5	Гидролизуемые таннины

15,980	277,32	Таннины
16,226	271,1; 344,4	Флавонол-3-гликозиды
16,569	275 пл.	Гидролизуемые таннины
16,814	275 пл.	Гидролизуемые таннины
16,956	280 пл.	Гидролизуемые таннины
17,249	280 пл.	Гидролизуемые таннины
17,735	275 пл.	Гидролизуемые таннины
17,991	280 пл.	Гидролизуемые таннины
18,164	275 пл.	Гидролизуемые таннины
18,507	274,5 пл.	Гидролизуемые таннины
18,642	274,4 пл.	Гидролизуемые таннины
18,860	275 пл.	Гидролизуемые таннины
19,088	275 пл.	Гидролизуемые таннины
19,593	275 пл.	Гидролизуемые таннины
19,749	253,4; 351,8	Флавонол-3-гликозиды

19,936	271,8	Таннины
20.286	265,4; 352,2	Флавонол-3-гликозиды
20,555	276,3	Таннины
20,876	265,8 пл.	Гидролизуемые таннины
21,099	275,1 пл.	Гидролизуемые таннины

На основе ВЭЖХ-УФ анализа фракций, полученных путем последовательной исчерпывающей ЖЖ-экстракции растворителями разной полярности (н-гексан, дихлорметан, н-бутанол) было установлено, что соединения полифенольной природы являются основными вторичными метаболитами листьев *R. chamaemorus*. Среди класса полифенольных соединений мажорными соединениями листьев *R. chamaemorus* являлись гидролизуемые и конденсированные таннины наряду с флавонол-3-гликозидами и фенолкарбоновыми кислотами.

2.3 Метод газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектором (ГХ-МС)

Проводился газовый хромато-масс-спектрометрический анализ этилацетатного извлечения, полученный из листьев *R. chamaemorus*, для определения состава основных летучих вторичных метаболитов (таблица 2.3).

Таблица 2.3

Соединения, обнаруженные в листьях *R. chamaemorus* с их соответствующими временами удерживания.

Время удерживания, мин	Обнаруженное соединение
1.480	Этилпропаноат
1.990	Гекс-3-еналь
2.190	Глицеральдегид
2.450	Гекс-3-ен-1-ол
2.640	-
2.705	-
3.000	-
3.585	4-Метилнонан-4-ол
4.070	Глицерин
4.345	транс-Гекс-3-еновая кислота
5.015	Мальтол
5.560	цис-Гекс-3-еналь диэтилацеталь
5.925	Фенилэтиловый спирт
6.700	2,3-Дигидро-3,5-дигидрокси-6-метил-4Н-пиран-4-он
7.360	2,3-Дигидробензофуран
7.585	5-Гидроксиметилфурфураль
8.510	1-Ацетилглицерин
8.880	1,2-Диацетилглицерин
9.125	2-Фенилэтилацетат
9.405	-
9.480	2-Метокси-4-винилфенол
10.050	Пропилпентаноат

10.850	-
11.620	2-Гидрокси-4-метилбензальдегид
11.885	-
12.880	1,6-Ангидро- β -D-глюкопираноза
14.605	1,4:3,6-Диангидро- α -D- глюкопираноза
15.310	-
15.710	-
16.940	-
17.790	Тирозилацетат
18.000	2,6-Диметокси-4-винилфенол
18.145	-
18.730	3-Гидрокси-4-пропилфенол
23.045	-
23.160	транс-1-Изопропенил-4-метил-1,4- циклогександиол
23.460	-
29.840	Фитол
32.700	Бензил- β -D-глюкопираноза
34.760	Амирин

Для этого, 10 г измельченных свежих листьев подвергали ультразвуковой экстракции в 250 мл этилацетата при комнатной температуре в течении 30 минут. Полученная вытяжка затем выпаривалась досуха, остаток растворяли в 5 мл 96% этанола. Спиртовой раствор фильтровали через шприцфильтр с диаметрами пор 0,20 мкм. 2 мкл отфильтрованного раствора вводился в инжектор хромато-масс-спектрометра с делением потока 1:200. Температура инжектора составляла

300°C, температурная программа термостата: 0.5 минутная выдержка при 100°C, подъем температуры до 280°C со скоростью 5°C/мин и выдержка 15 минут при 280°C. Температура ионного источника составляла 200°C, температура интерфейса 250°C, сканирование велось со скоростью 1666 в диапазоне 50-500 m/z . В результате была получена ГХ-МС хроматограмма этилацетатного извлечения из листьев *R. chamaemorus* (рисунок 2.8).

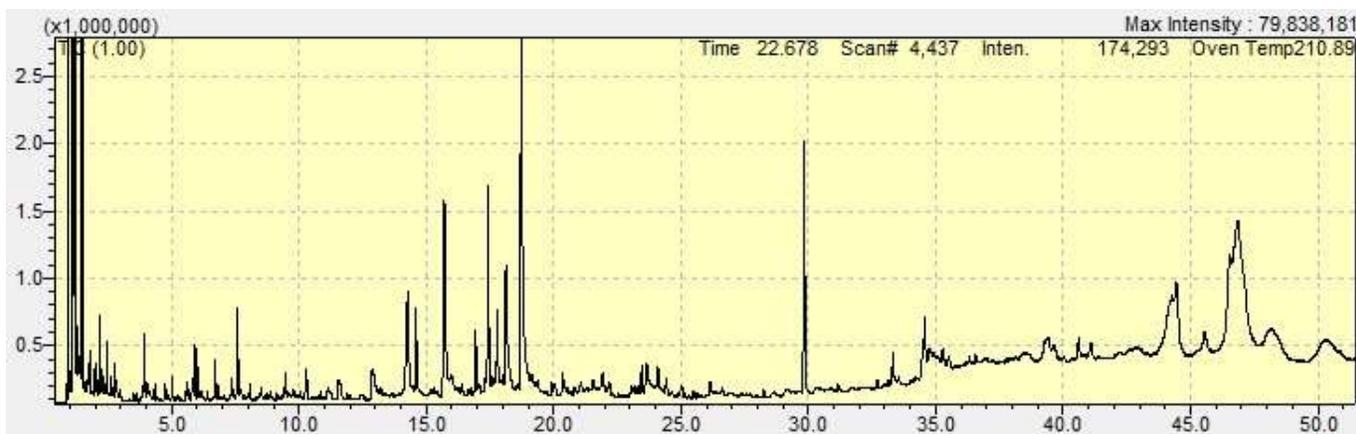
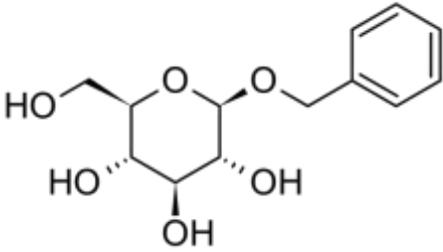
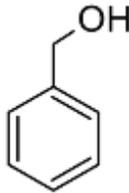
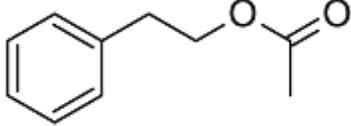
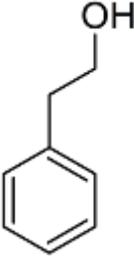
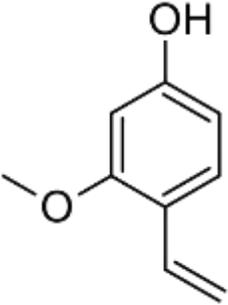
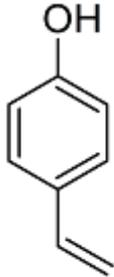
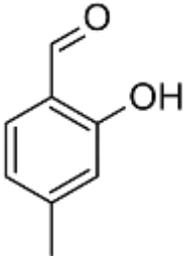
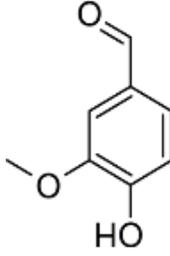
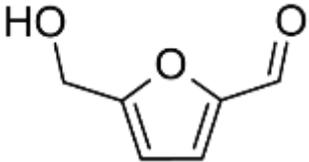
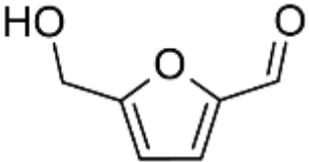
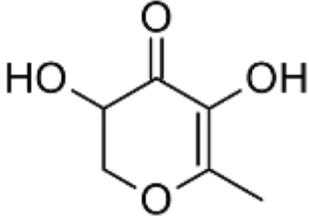
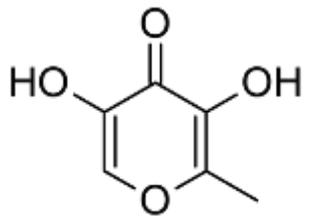


Рисунок 2.8. ГХ-МС хроматограмма этилацетатного извлечения из листьев *R. chamaemorus*.

В таблице 8 приведены основные соединения, которые были идентифицированы в сравнении с данными библиотеки хромато-массспектрометрических данных NIST 11 с учетом их индексов удерживания. Сравнивая соединения, обнаруженные нами в листьях *R. chamaemorus*, с соединениями, обнаруженными в эфирном масле плодов *R. chamaemorus* [60,62], можно провести ряд параллелей (таблица 2.4).

Сравнение структур схожих метаболитов листьев и плодов *R.**chamaemorus.*

Метаболиты листьев <i>R. chamaemorus</i>	Метаболиты плодов <i>R. chamaemorus</i>
 <p data-bbox="321 762 760 800">Бензил-β-D-глюкопираноза</p>	 <p data-bbox="1013 762 1308 800">Бензиловый спирт</p>
 <p data-bbox="423 1125 660 1163">Тирозилацетат</p>	 <p data-bbox="1094 1125 1227 1163">Тирозол</p>
 <p data-bbox="342 1535 740 1572">3-метокси-4-винилфенол</p>	 <p data-bbox="1049 1535 1276 1572">4-винилфенол</p>
 <p data-bbox="277 1885 805 1923">2-гидрокси-4-метилбензальдегид</p>	 <p data-bbox="1094 1885 1227 1923">ванилин</p>

 <p>5-гидроксиметилфурфурол</p>	 <p>5-гидроксиметилфурфурол</p>
 <p>2,3-дигидро-3,5-дигидрокси-2-метил-4Н-пиран-4-он</p>	 <p>3,5-дигидрокси-2-метил-4Н-пиран-4-он</p>

Основные группы соединений, которые встречаются как в листьях, так и в эфирном масле *R. chamaemorus* это, в первую очередь, ароматические соединения - производные винилфенолов, бензилового альдегида, бензилового спирта, тирозолов и кислород содержащих гетероциклических соединений пиранового и фуранового ряда. Схожесть в составе ароматических соединений листьев и плодов потенциально указывает на важную роль данных соединений в метаболизме *R. chamaemorus*.

2.4 Прогноз биологической активности основных вторичных метаболитов листьев *Rubus Chamaemorus*

Оценка *in silico* спектров биологической активности соединений **1-12** была получена с использованием компьютерной программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances, версия 2020 Refined), которая прогнозирует 1897 фармакологических эффектов и механизмов действия со средней точностью 97% [59]. Прогноз осуществляется на основе анализа взаимосвязей «структура-активность» обучающей выборки, содержащей свыше 1,3 млн веществ с

экспериментально установленной биологической активностью. Входной информацией для программы PASS являются структурные формулы соединений, представленные в виде MOL или SDF файлов. Выходная информация – список вероятных видов активности с двумя параметрами P_a и P_i , характеризующими вероятности наличия и отсутствия активности, соответственно. Ранее с использованием программы PASS были выполнены предсказания фармакологического потенциала для вторичных метаболитов ряда лекарственных растений, подтвержденные в эксперименте.

С учётом наличия литературных данных о применении листьев *R. chamaemorus* в народной медицине в качестве вяжущего, кровоостанавливающего, мочегонного, противовоспалительного и ранозаживляющего действия, все выделенные индивидуальные соединения являются перспективными для оценки фармакологического потенциала методами *in silico* и в последующих экспериментальных исследованиях.

По данным литературы известно, что в *R. chamaemorus* содержатся флавоноиды и О-гликозиды флавоноидов [39, 79]. Однако это первое сообщение о выделении и установлении структуры С-гликозидов флавонов из листьев *R. chamaemorus*, а также из видов рода *Rubus*. В этом исследовании нам удалось выделить и установить структуру трех Сгликозидов флавонов и предложить структуру для пяти других С-гликозидов флавонов (рисунок 10) на основе данных гидролиза их ацетатов с последующим хроматографическим анализом.

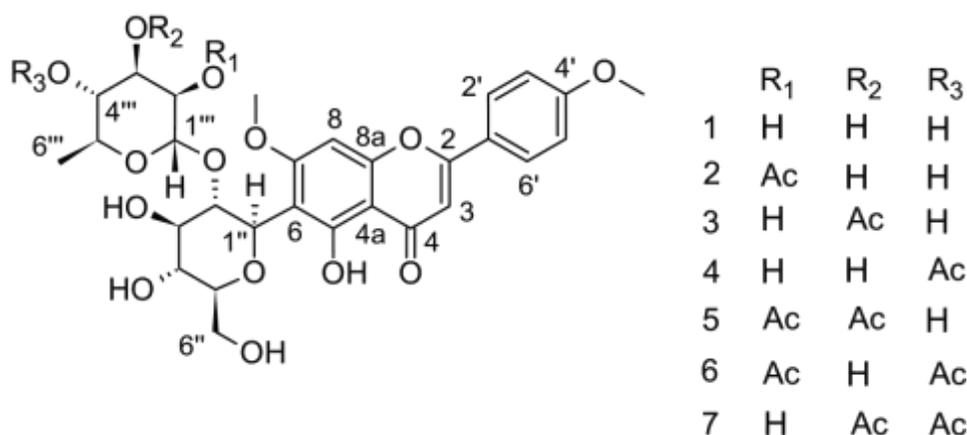


Рисунок 2.9. Структура эмбинина (1) и его моно- и диацетатных производных (2-7).

Все выделенные из *R. chamaemorus* С-гликозиды представляют собой моно- и диацетаты эмбинина, ранее обнаруженные только в растениях рода *Iris* [81-83]. Семь идентифицированных С-гликозидов в *R. chamaemorus* представляют собой:

- 1) 5-гидрокси-7,4'-диметоксифлаво-6-С-[О-(α-L-рамнопиранозил)-1→2-β-D-глюкопиранозид] (эмбинин) (1)
- 2) 5-гидрокси-7,4'-диметоксифлаво-6-С-[О-(α-L-2'''ацетилрамнопиранозил)-1→2-β-D-глюкопиранозид] (2'''-ацетилэмбинин) (2)
- 3) 5-гидрокси-7,4'-диметоксифлаво-6-С-[О-(α-L-3'''ацетилрамнопиранозил)-1→2-β-D-глюкопиранозид] (3'''-ацетилэмбинин) (3)
- 4) 5-гидрокси-7,4'-диметоксифлаво-6-С-[О-(α-L-4'''ацетилрамнопиранозил)-1→2-β-D-глюкопиранозид] (4'''-ацетилэмбинин)(4)
- 5) 5-гидрокси-7,4'-диметоксифлаво-6-С-[О-(α-L-2''',3'''-диацетилрамнопиранозил)-1→2-β-D-глюкопиранозид] (2''',3'''-диацетилэмбинин) (5)
- 6) 5-гидрокси-7,4'-диметоксифлаво-6-С-[О-(α-L-2''',4'''-диацетилрамнопиранозил)-1→2-β-D-глюкопиранозид] (2''',4'''-диацетилэмбинин) (6)

7) 5-гидрокси-7,4'-диметоксифлавонон-6-С-[О-(α -L-3'',4''-диацетилрамнопиранозил)-1 \rightarrow 2- β -D-глюкопиранозид] (3'',4''-диацетилэмбинин) (7).

Соединения **1-7** - С-гликозиды флавонов, представляющие собой эмбинин и его моно- и диацетатные производные. Соединения данной группы имеют среднюю полярность, хорошо растворимы в полярных органических растворителях, но практически нерастворимы в воде. Их особенностью является наличие трудно гидролизуемой С-гликозидной связи в молекуле, что вероятно значительно влияет на их биодоступность.

Оценка спектра фармакологического потенциала семи выделенных и обнаруженных С-гликозидов проведена с помощью программы PASS. Число различных видов активности, которые прогнозируются для этих соединений при различных пороговых значениях Pa-Pi, приведено на рисунке 2.10.

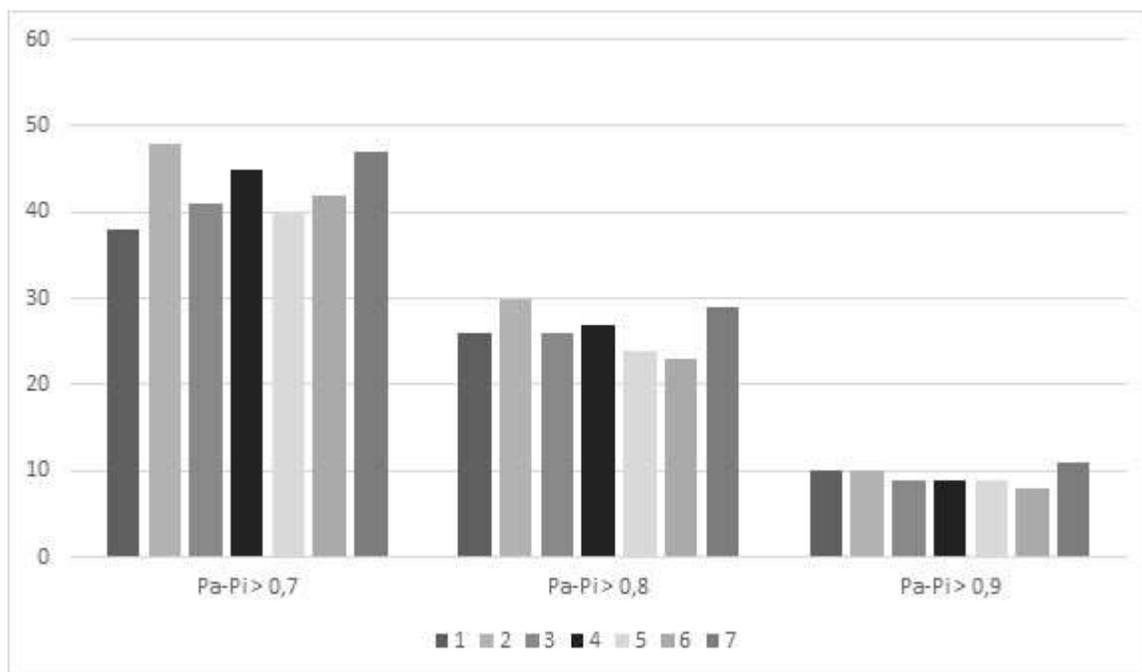


Рисунок 2.10 Число видов фармакологической активности, предсказанных при различных пороговых значениях Pa-Pi для соединений **1-7**

По итогам проведения группового фитохимического анализа было выявлено, что флавоноиды, гидролизуемые и конденсированные танины наряду с их О-гликозидами являются основной группой вторичных метаболитов, содержащиеся в листьях *R. chamaemorus*. Наибольшее количество и разнообразие соединений из этих групп было обнаружено в водно-метанольном и н-бутанольном фракциях, полученных после проведения всех этапов ЖЖ-экстракции с н-гексаном, дихлорметаном и нбутанолом. В результате анализа полярных фракций удалось выделить соединения **8-12** (рисунок 2.11) [67].

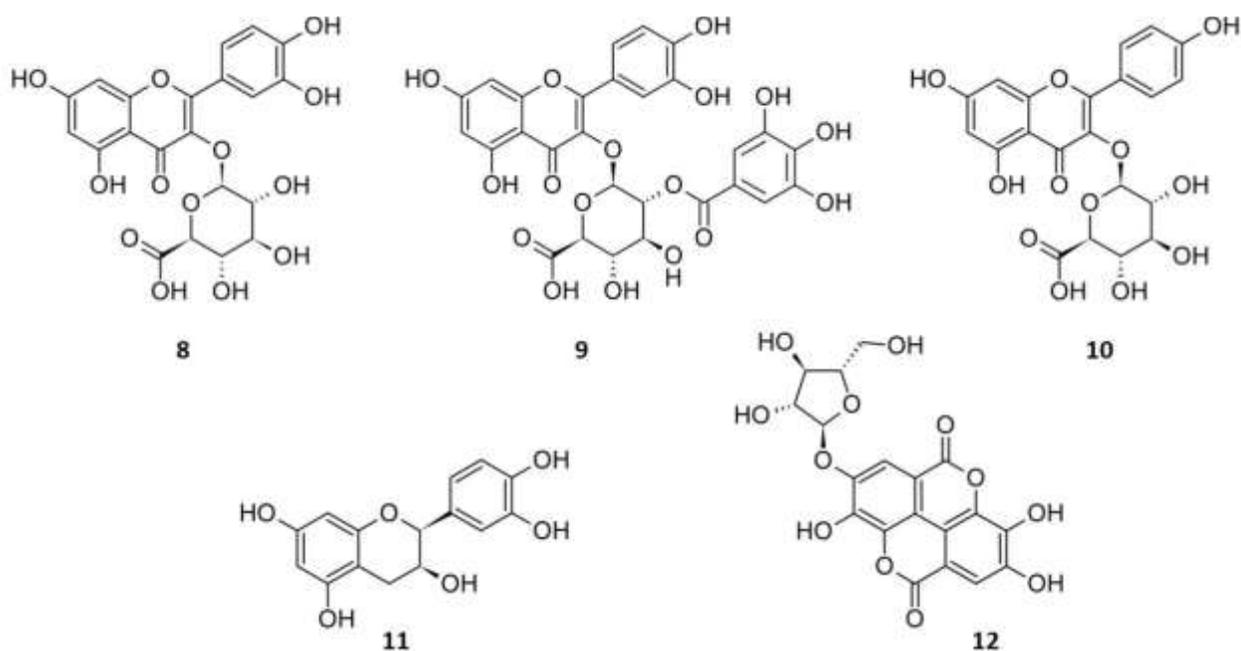


Рисунок 2.11. Структура соединений **8-12**.

Соединения **8, 9, 10** – полярные глюкуроновые гликозиды флавонолов, являются мажорной группой вторичных метаболитов флавоноидной природы в листьях *R. chamaemorus* и, вследствие содержания в своем составе остатка уроновой кислоты, хорошо растворимы в воде, что позволяет предполагать их хорошую биодоступность. Соединения **11** и **12** являются представителями класса

танинов, имеющие среднюю растворимость в воде. Присутствующие в их структуре фенольные гидроксилы, вероятно, играют основную роль в их биодоступности и метаболизме.

Оценка спектра фармакологического потенциала для соединений **8-12** проведена с помощью программы PASS. Число различных видов активности, которые прогнозируются для этих соединений при различных пороговых значениях P_a-P_i , приведено на рисунке 2.10

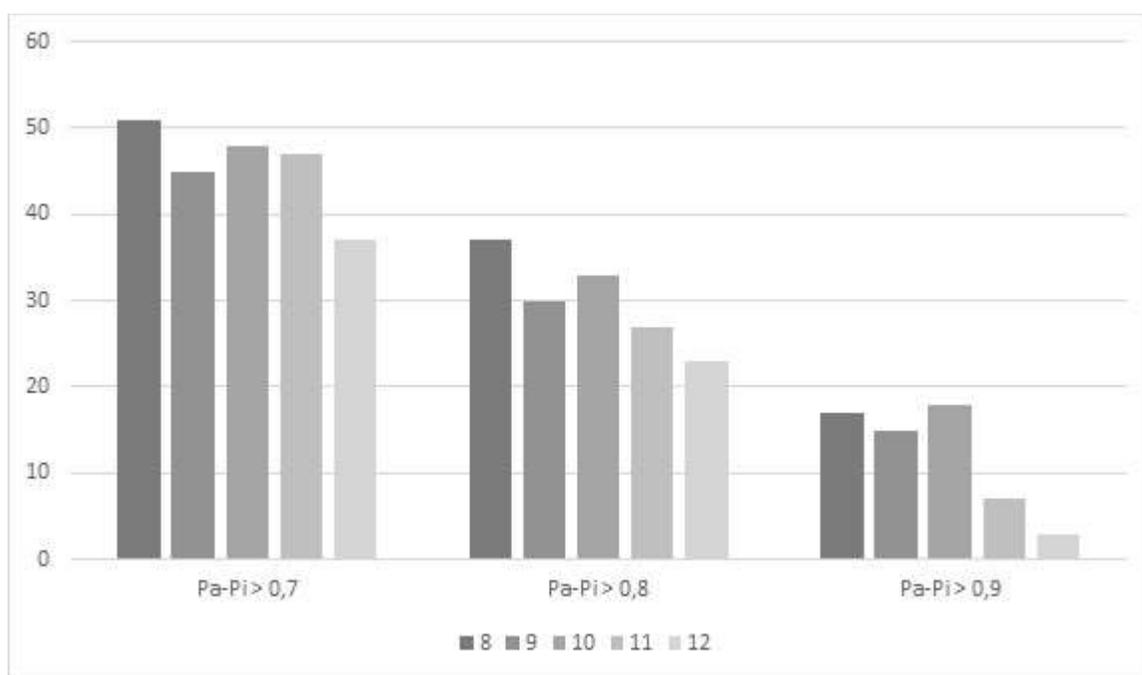


Рисунок 2.10 Число видов фармакологической активности, предсказанных при различных пороговых значениях P_a-P_i для соединений **8-12**

Из представленных на рисунках 29 и 30 данных видно, что при пороге по значениям $P_a-P_i > 0,7$ для соединения **1** прогнозируется 38 фармакологических активностей, для соединения **2** – 48, для соединения **3** – 41, для соединения **4** – 45, для соединения **5** – 48, для соединения **6** – 42, для соединения **7** – 47, для соединения **8** – 51, для соединения **9** – 45, для соединения **10** – 48, для соединения **11** – 47 и для соединения **12** - 37. При повышении пороговых значений число прогнозируемых видов активности снижается для каждого из анализируемых соединений.

Информация обо всех видах фармакологической активности, предсказанных для соединений **1-7** при пороге 0,9 приведена в таблице 2.4. В ячейках таблицы приведены величины P_a-P_i для всех видов активности, вероятность которых превышает пороговые значения; прочерк означает, что конкретный вид активности для анализируемого соединения при рассматриваемом пороговом значении не прогнозируется.

Таблица 2.4.

Виды фармакологической активности, предсказанные для С-гликозидов с оценками вероятностей P_a-P_i , превышающими 0.9

Прогнозируемые виды фармакологической активности	Идентификаторы выделенных соединений						
	1	2	3	4	5	6	7
Гипогликемическое	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
Антимутагенное	0,97	0,96	0,90	0,92	0,95	0,95	0,96
Хемопревентивное	0,95	0,97	0,96	0,96	0,97	0,95	0,97
Ингибитор экспрессии NOS2	0,93	0,93	-	0,92	0,90	0,90	0,92
Цитостатическое	0,91	0,93	-	-	0,91	0,91	0,92
Противодиабетическое	0,90	-	-	-	-	-	-
Гипохолестеринемическое	-	-	0,92	-	-	-	-

Информация обо всех видах фармакологической активности, предсказанных для соединений **8-12** при пороге 0,9 приведена в таблице 2.5. В ячейках таблицы приведены величины P_a-P_i для всех видов активности, вероятность которых превышает пороговые значения; прочерк означает, что конкретный вид активности для анализируемого соединения при рассматриваемом пороговом значении не прогнозируется.

Таблица 2.5.

Виды фармакологической активности, предсказанные для пяти соединений с оценками вероятностей P_a - P_i , превышающими 0.9

Прогнозируемые виды фармакологической активности	Идентификаторы выделенных соединений				
	8	9	10	11	12
Антимутагенное	0.98	0.97	0.97	0.92	0.96
Антиоксидантное	0.94	0.93	0.93	0.94	-
Хемопревентивное	0.96	0.97	0.93	-	-
Ингибитор экспрессии ФНО	0.95	0.94	0.93	-	-
Ингибитор экспрессии NOS2	0.96	-	0.90	-	-
Радиопротекторное	0.94	0.90	-	-	-
Антигипоксантное	0.93	-	0.91	-	-
Антигиперхолестеринемическое	0.90	-	0.91	-	-
Коронарный вазодилататор	0.92	-	-	-	-
Акцептор свободных радикалов	-	0.90	-	-	-

Как видно из представленных выше данных, разнообразие прогнозируемых для выделенных из листьев *R. chamaemorus* соединений видов активности подтверждает широкий спектр фармакологических эффектов и механизмов действия, которыми могут обладать эти вещества. В частности, ряд предсказанных с высокой вероятностью видов активности указывает на перспективность изучения возможности применения этих соединений в качестве фармакологических веществ с антидиабетическим и хемопревентивным

действием, которые ранее не были установлены для экстрактов из плодов *R. chamaemorus*.

При планировании экспериментальных исследований общей рекомендацией является последовательное исследование различных прогнозируемых видов биологической активности, от наиболее вероятных к менее вероятным.

Учитывая перспективность изучения оригинальных природных соединений в качестве потенциальных лекарственных средств, проведенное в настоящей работе выделение новых вторичных метаболитов из листьев *R. chamaemorus* и установление их структуры вносит весомый вклад в развитие фитохимических исследований в этой области.

Выводы к разделу 2

Основные группы соединений, которые встречаются как в листьях, так и в эфирном масле *R. chamaemorus* это, в первую очередь, ароматические соединения - производные винилфенолов, бензилового альдегида, бензилового спирта, тирозолов и кислород содержащих пирановых гетероциклических соединений и фурана. Разнообразие прогнозируемых для выявленных из листьев *R. chamaemorus* соединений видов активности подтверждает широкий спектр фармакологических эффектов и механизмов действия, которыми могут обладать эти вещества. Среди класса полифенольных соединений мажорными соединениями листьев *R. chamaemorus* были гидролизованные и конденсированные танины наряду с флавонол-3-гликозидами и фенолкарбоновыми кислотами.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

Установлены основные группы вторичных метаболитов, содержащихся в листьях *R. chamaemorus*, с использованием современных физико-химических методов анализа (ВЭТСХ, ВЭЖХ-УФ). К ним относятся гидролизованные и конденсированные танины, фенолкарбоновые кислоты и флавонол-3-О-глюкурониды.

Методом ГХ-МС установлено содержание 28 соединений в листьях *R. chamaemorus*, относящихся к группам алифатических и ароматических спиртов, альдегидов и карбоновых кислот, а также их производных.

Осуществлен компьютерный прогноз биологической активности выделенных из листьев *R. chamaemorus* индивидуальных соединений с помощью программы PASS (Prediction of Activity Spectra for Substances, версия 2020 Refined) и составлен перечень наиболее вероятных типов потенциальной фармакологической активности с $P_a - P_i > 0,9$, среди которых антидиабетическое и хемопреентивное действие являются наиболее вероятными.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Bernardini S., Tiezzi A., Laghezza Masci V., Ovidi E. Natural products for human health: an historical overview of the drug discovery approaches // *Natural Product Research*, 2018. Vol.32 No. 16. P. 1926-1950.
2. Balandrin M. F., Klocke J. A., Wurtele E. S., Bollinger W. H. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials // *Science*, 1985. Vol. 228. P. 1154-60.
3. Mouhssen L. Screening of natural products for drug discovery // *Expert Opinion on Drug Discovery*, 2007. Vol. 2. No. 5. P. 697-705.
4. Ossipov V., Salminen J.-P., Ossipova S., Haukioja E., Pihlaja K. Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway // *Biochemical Systematics and Ecology*, 2003. Vol. 31. P. 3-16.
5. Salminen J.-P., Ossipov V., Haukioja E., Pihlaja K. Seasonal variation in the content of hydrolysable tannins in leaves of *Betula pubescens* // *Phytochemistry*, 2001. Vol. 57. P. 15-22.
6. Koleckar V., Kubikova K., Rehakova Z., Kuca K., Jun D., Jahodar L., Opletal L. Condensed and Hydrolysable Tannins as Antioxidants Influencing the Health // *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2008. Vol. 8. No. 5. P. 436–447.
7. Kähkönen M., Kylli P., Ollilainen V., Salminen J., Heinonen M. Antioxidant Activity of Isolated Ellagitannins from Red Raspberries and Cloudberries // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012. Vol. 60. No. 5. P. 1167-1174.
8. Thiem B. *Rubus chamaemorus* L. - a boreal plant rich in biologically active metabolites: A review // *Biological Letters*, 2003. Vol. 40. No.1. P. 3-13.
9. Taylor K. Biological flora of the British Isles. *Rubus chamaemorus* L. // *Journal of Ecology*, 1971. Vol. 59. P. 293-306.
10. Lohi K. Variation between cloudberries (*Rubus chamaemorus* L.) in different habitats // *Aquilo. Ser. botanica*, 1974. Vol 13. P 19.

11. Ågren J. Seed size and number in *Rubus chamaemorus*: between habitat variation, and effects of defoliation and supplemental pollination // *Journal of Ecology*, 1989. Vol. 77. P. 1080-1092.
12. Taylor K. The absence of mycorrhiza in *Rubus chamaemorus* // *Annales Botanici Fennici*, 1990. Vol. 26. P. 421-425.
13. Yudina V. F. Phenological development and yields of cloudberry (*Rubus chamaemorus*) in Karelia, Russia // *Annales Botanici Fennici*, 1993. Vol. 149. P. 710.
14. Korpelainen H. Sex rations and resource allocation among sexually reproducing plants of *Rubus chamaemorus* // *Annales Botanici Fennici*, 1994. Vol. 74. P. 627-632.
15. Уэйли А.К., Понкратова А.О., Теслов Л.С., Лужанин В.Г. Обзор вторичных метаболитов морошки и их биологической активности // *Медикофармацевтический журнал «Пульс»*, 2020. Т. 22. №7. С. 50-59.
16. Becker P. Tannin Structure and Function: Keeping Our Perspective // *The American Naturalist*, 1984. Vol. 124. No. 1. P. 134–136.
17. Ossipov V., Salminen J.-P., Ossipova S., Haukioja E., Pihlaja K. Gallic acid and hydrolysable tannins are formed in birch leaves from an intermediate compound of the shikimate pathway // *Biochemical Systematics and Ecology*, 2003. Vol. 31. P. 3-16.
18. Salminen J.-P., Ossipov V., Haukioja E., Pihlaja K. Seasonal variation in the content of hydrolysable tannins in leaves of *Betula pubescens* // *Phytochemistry*, 2001. Vol. 57, P. 15-22.
19. Okuda T., Yoshida T., Hatano T. Oligomeric hydrolyzable tannins, a new class of plant polyphenols // *Heterocycles*, 1990. Vol. 30. P. 1195-1218.
20. Haslam E. *The Biochemistry of Plants* // Academic Press: London, 1981.
21. De Bruyne T., Pieters L., Deelstra H., Vlietinck A. Condensed vegetable tannins: Biodiversity in structure and biological activities // *Biochemical Systematics and Ecology*, 1999. Vol. 27. P. 445-459.

22. Kähkönen M., Hopia A., Heinonen M. Berry Phenolics and Their Antioxidant Activity // *Journal of agricultural and food chemistry*, 2001. Vol. 49. No. 8. P. 4076-4082.
23. Jaakkola M., Korpelainen V., Hoppula K., Virtanen V. Chemical composition of ripe fruits of *Rubus chamaemorus* L. grown in different habitats // *Journal of the science of food and agriculture*, 2012. Vol. 92. No. 6. P. 1324-1330.
24. Bule M., Khan F., Nisar M. F., Niaz, Kamal. *Recent Advances in Natural Products Analysis*. Elsevier, 2020. P. 132-146.
25. Bate-Smith E.C., Swain, T. *Comparative Biochemistry*. Academic Press, New York, 1957.
26. Khanbabee K., van Ree T. Tannins: Classification and Definition // *Natural Product Reports*, 2001. Vol. 18. P. 641-649.
27. Cos P., De Bruyne T, Hermans N., Apers S., Berghe D.V., Vlietinck A.J. Proanthocyanidins in health care: current and new trends // *Current Medicinal Chemistry*, 2004. Vol. 11. No. 10. P. 1345-59.
28. Ferreira D., Slade D. Oligomeric proanthocyanidins: naturally occurring O-heterocycles // *Natural Product Reports*, 2002. Vol. 19. No. 5. P. 517–541.
29. Haslam E. Symmetry and promiscuity in procyanidin biochemistry // *Phytochemistry*, 1977. Vol. 16. No. 11. P. 1625-1640.
30. Xie D.-Y., Dixon, R. A. Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers? // *Phytochemistry*, 2005. Vol. 66. No. 18. P. 2127–2144.
31. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols // *Journal of Nutrition*, 2000. Vol. 130. No. 8. P. 2073-2085.
32. Macakova K., Koleckar V., Cahlikova L., Chlebek J., Host'alkova A, Kuca K., Jun D., Opletal L. Tannins and their Influence on Health. *Recent Advances in Medicinal Chemistry*, Elsevier, 2014. P. 159-208.
33. Haddock E. A., Gupta R. K., Al-Shafi S. M. K., Layden K., Haslam E., Magnolato D. The metabolism of gallic acid and hexahydroxydiphenic acid in plants:

Biogenetic and molecular taxonomic considerations // *Phytochemistry*, 1982. Vol. 21. P. 1049-1062.

34. Porter L. J. Tannins. *Methods in Plant Biochemistry*, Academic Press Limited, San Diego, 1989. P. 389.

35. Bate-Smith E. Detection and determination of ellagitannins // *Phytochemistry*, 1972. Vol. 11. P. 1153-1156.

36. Zafrilla P., Ferreres F., Tomás-Barberán F. A. Effect of processing and storage on the antioxidant ellagic acid derivatives and flavonoids of red raspberry (*Rubus idaeus*) jams // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2001. Vol. 49. P. 3651-3655.

37. Mullen W., Yokota T., Lean M. E., Crozier A. Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC-MS // *Phytochemistry*, 2003. Vol. 64. P. 617- 624.

38. McDougall G., Martinussen I., Junttila O., Verrall S., Stewart D. Assessing the Influence of Genotype and Temperature on Polyphenol Composition in Cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) Using a Novel Mass Spectrometric Method // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011. Vol. 59. No. 20. P. 10860- 10868.

39. Kaisu M., Afaf K., Törrönen A.R. Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Berries of *Fragaria* and *Rubus* Species (Family Rosaceae) // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004. Vol. 52. No. 20. P. 6178-6187.

40. Bors W, Michel C, Stettmaier K. Antioxidant effects of flavonoids // *Biofactors*, 1997. Vol. 6. No. 4. P. 399-402.

41. Lopez-Revuelta A., Sanchez-Gallego J.I., Hernandez-Hernandez A., Sanchez-Yague J., Llanillo M. Membrane cholesterol contents influence the protective effects of quercetin and rutin in erythrocytes damaged by oxidative stress // *Chemico-Biological Interactions*, 2006. Vol. 15. No. 1. P. 79-91.

42. Youdim K.A., Shukitt-Hale B., Joseph J.A. Flavonoids and the brain:

interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system // *Free Radical biology and Medicine*, 2004. Vol. 37. No.11. P. 1683-1693.

43. Russo A., Cardile V., Lombardo L., Vanella L., Acquaviva R. Genistin inhibits UV light-induced plasmid DNA damage and cell growth in human melanoma cells // *Journal of Nutritional biochemistry*, 2006. Vol. 17. No. 2. P.103-108.

44. Cimino F., Saija A. Flavonoids in skin cancer chemoprevention // *Current Research in Nutrition and Food Science*, 2005. Vol. 3 No. 4. P. 243-258.

45. Martinussen I., Uleberg E., Mcdougall G., Stewart D., Junttila O. Development and quality of cloudberry (*Rubus chamaemorus* L.) as affected by female parent, male parent and temperatur // *Journal of Berry Research*, 2010. Vol. 1. No. 2. P. 91-101.

46. Andersen, Ø. M. Anthocyanins. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2001.

47. Herrmann K. On the occurrence of flavonols and flavone glycosides in vegetables // *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 1988. Vol. 186. P. 1-5.

48. Clifford M. N. Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, and dietary burden // *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 1999. Vol. 79. P. 362–372.

49. Strack D. Phenolic metabolism. *Plant Biochemistry*, Academic, London, 1997, P. 387.

50. Khoddami A., Wilkes M.A., Roberts T.H. Techniques for analysis of plant phenolic compounds // *Molecules*, 2013. Vol. 18. P. 2328–2375.

51. Shahidi F., Nacsk M. *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects, and Application*. Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA, 1995.

52. Qualley A.V., Widhalm J.R., Adebessin F., Kish C.M., Dudareva N. Benzoic acid biosynthesis in plants // *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012. Vol. 109. No. 40. 16383-16388.

53. Denzel K., Gross G.G. Biosynthesis of gallotannins. Enzymatic 'disproportionation' of 1,6-digalloylglucose to 1,2,6-trigalloylglucose and 6galloylglucose by an acyltransferase from leaves of *Rhus typhina* L. // *Planta*, 1991. No. 184, P. 185-289.
54. Frohlich B., Niemetz R., Gross G.G. Gallotannin biosynthesis: two new galloyltransferases from *Rhus typhina* leaves preferentially acylating hexa- and heptagalloylglucoses // *Planta*, 2002. Vol. 216. No. 1. P.168-72.
55. Gross G.G., Denzel K. Biosynthesis of Gallotannins. β -glucogallindependent galloylation of 1,6-digalloylglucose to 1,2,6-trigalloylglucose // *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 1991. Vol. 46. P. 389394.
56. Niemetz R., Schilling G., Gross G.G. Ellagitannin biosynthesis: oxidation of pentagalloylglucose to tellimagrandin II by an enzyme from *Tellima grandiflora* leaves. // *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications*, 2001. Vol. 1. P. 35-36.
57. Schulenburg K., Feller A., Hoffmann T., Schecker J.H., Martens S., Schwab W. Formation of β -glucogallin, the precursor of ellagic acid in strawberry and raspberry // *Journal of Experimental Botany*, 2016. Vol. 167. No. 8. P. 22992308.
58. Nagayama T., Nishijima M., Yasuda K., Saito K., Kamimura H., Ibe A., Ushiyama H., Nagayama M., Naoi Y. Benzoic acid in fruits and fruit products // *Food Hygiene and Safety Science*, 1983. Vol. 24. P. 416-422.
59. Nagayama T., Nishijima M., Yasuda K., Saito K., Kamimura H., Ibe A., Ushiyama H., Naoi Y. and Nishima T. Benzoic acid in agricultural food products and processed foods // *Food Hygiene and Safety Science*, 1986. Vol. 27. P. 316-325.
60. Honkanen E., Pyysalo T. The aroma of cloudberries (*Rubus chamaemorus*) // *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 1976. Vol. 160. No. 4. P. 393-400.
61. Nohynek L., Bailey M., Tähtiharju J., Seppänen-Laakso T., Rischer H.,

Oksman-Caldentey K.-M., Puupponen-Pimiä R. Cloudberry (*Rubus chamaemorus*) cell culture with bioactive substances: Establishment and mass propagation for industrial use // *Engineering in Life Sciences*, 2014. Vol. 14. No. 6. P. 667-675.

62. Pyysalo T., Honkanen E. The influence of heat on the aroma of cloudberry (*Rubus Chamaemorus* L.). // *Zeitschrift für Lebensmittel Untersuchung und Forschung*, 1977. Vol. 163. No. 1. P. 25-30.

63. Rocabado G., Bedoya L., Abad M., Bermejo P. *Rubus* - A Review of its Phytochemical and Pharmacological Profile // *Natural Product Communications*, 2008. Vol. 3. No. 3. P. 423-436.

64. Махлаюк В. П. Лекарственные растения в народной медицине. Приволжское книжное издательство, Саратов, 1991. С. 544.

65. Luigi M., Luca D., Norum R., Scurvy and Cloudberry: A chapter in the history of nutritional sciences // *The journal of Nutrition*, 2011. Vol. 141. No. 12. P. 2101-2105.

66. Puupponen-Pimia R., Nohynek L., Alakomi H., Oksman-Caldentey K. The action of berry phenolics against human intestinal pathogens // *BioFactors*, 2005. Vol. 23. No. 4. P. 243-251.

67. Davidson P.M., Cekmer H.B., Monu E.A., Techathuvanan C. The use of natural antimicrobials in food: an overview. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality*, 2015. P. 7.

68. Nohynek L., Alakomi H., Kähkönen M., Heinonen M. Berry Phenolics: Antimicrobial Properties and Mechanisms of Action Against Severe Human Pathogens // *Nutrition and Cancer*, 2006. Vol. 54. No. 1. P. 18-32.

69. Thiem B., Goslinska J. Antimicrobial activity of *Rubus chamaemorus* leaves // *Fitoterapia*, 2004. Vol. 75. P. 93- 95.

70. Anthony J.-P., Fyfe L., Stewart D., Mcdougall G.J. Differential effectiveness of berry polyphenols as anti-giardial agents // *Parasitology*, 2011. Vol. 138. No. 9. P. 1110-1116.

71. Puupponen-Pimiä R., Nohynek L., Juvonen R., Kössö T., Truchado P. Fermentation and dry fractionation increase bioactivity of cloudberry (*Rubus chamaemorus*) // *Food Chemistry*, 2016. Vol. 197. P. 950-958.
72. Gustinelli G., Eliasson L., Svelander C., Andlid T., Lundin L., Ahrne L., Alminger M. Supercritical Fluid Extraction of Berry Seeds: Chemical Composition and Antioxidant Activity // *Journal of Food Quality*, 2018. P. 1-10.
73. Kähkönen M., Kylli P., Ollilainen V., Salminen J.P., Heinonen M. Antioxidant activity of isolated ellagitannins from red raspberries and cloudberries // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012. Vol. 60. No. 5. P. 1167-1174.
74. Bezmaternykh K.V., Shirshova T.I., Beshlei I.V., Matistov N.V., Smirnova G.V., Oktyabr'skii O.N., Volodin V. Antioxidant activity of extracts from *Allium schoenoprasum* L. and *Rubus chamaemorus* L. growing in the Komi Republic // *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 2014. Vol. 40. No. 2. P. 36-40.
75. Lashmanova E., Kuzivanova O., Dymova O., Moskalev A. The Effects of Cloudberry Fruit Extract on *Drosophila melanogaster* Lifespan and Stress Resistance // *Advances in Gerontology*, 2019. Vol. 9 No. 2. P. 254-260.
76. Lashmanova E., Kuzivanova O., Dymova O., Proshkina E., Moskalev A. The effects of cloudberry extract and b-carotene on lifespan of *Drosophilla melanogaster* // *New biotechnology*, 2016. Vol. 33. P. 91.
77. Afrin S., Giampieri F., Gasparri M., ForbesHernandez T., Varela-Lopez A., Quiles J. Chemopreventive and Therapeutic Effects of Edible Berries: A Focus on Colon Cancer Prevention and Treatment // *Molecules*, 2016. Vol. 21. No. 2. P. 169.
78. McDougall G.J., Ross H.A., Ikeji M., Stewart D. Berry Extracts Exert Different Antiproliferative Effects against Cervical and Colon Cancer Cells Grown in Vitro // *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008. Vol. 56. No. 9. P. 3016-3023.
79. Häkkinen S.H., Kärenlampi S.O., Heinonen I.M., Mykkänen H.M.,

Törrönen A.R. Content of the Flavonols Quercetin, Myricetin, and Kaempferol in 25 Edible Berries // Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1999. Vol. 47. No. 6. P. 2274-2279.

80. Уэйли А.К., Понкратова А.О., Орлова А.А., Серебряков Е.Б., Селиванов С.И., Кривошеков С.В., Белоусов М.В., Прокш П., Лужанин В.Г. Анализ С-гликозидов флавонов и продуктов ступенчатого гидролиза их ацетатов в листьях *Rubus chamaemorus* L. // Химия растительного сырья, 2021. No. 2. С. 257-265.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение А



МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК ВИЩОЇ ОСВІТИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ХІМІЇ ПРИРОДНИХ СПОЛУК І НУТРИЦІОЛОГІЇ

СЕРТИФІКАТ

№ 73

Цим засвідчується, що

Ал Хажж Хассан Зу Ел Фікар

брав(ла) участь у роботі V Міжнародної
науково-практичної Інтернет-конференції

**"СУЧАСНІ ДОСЯГНЕННЯ ФАРМАЦЕВТИЧНОЇ НАУКИ
В СТВОРЕННІ ТА СТАНДАРТИЗАЦІЇ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ
І ДІЄТИЧНИХ ДОБАВОК, ЩО МІСТЯТЬ КОМПОНЕНТИ
ПРИРОДНОГО ПОХОДЖЕННЯ"**

(тривалість – 6 годин)

14 квітня 2023 р., м. Харків, Україна

Ректор НФаУ,
д. фарм. н., проф.Проректор з науково-педагогічної
роботи НФаУ, д. фарм. н., проф.Завідувач кафедри хімії природних сполук
і нутриціології НФаУ, д. фарм. н., проф.

Алла КОТВИЦЬКА

Інна ВЛАДИМИРОВА

Вікторія КИСЛИЧЕНКО

Национальный фармацевтический университет

Факультет по подготовке иностранных граждан
Кафедра фармакогнозии

Степень высшего образования магистр
Специальность 226 Фармация, промышленная фармация
Образовательная программа Фармация

УТВЕРЖДАЮ
Заведующая кафедрой
фармакогнозии

Ольга МАЛАЯ
“28” сентября 2022 года

ЗАДАНИЕ
НА КВАЛИФИКАЦИОННУЮ РАБОТУ
СОИСКАТЕЛЯ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ

Ал Хажж Хассан Зу Эл Фикар

1. Тема квалификационной работы: «Фитохимическое изучение листьев Морошки», руководитель квалификационной работы: Николай КОМИССАРЕНКО, к.фарм.н., ассистент, утвержденный приказом НФаУ от “6” лютого 2023 года № 36
2. Срок подачи соискателем высшего образования квалификационной работы: апрель 2023 г.
3. Исходящие данные к квалификационной работе: Фитохимическое изучение листьев Морошки
4. Содержание расчетно-пояснительной записки (перечень вопросов, которые необходимо разработать): исследовать литературные данные о составе биологически активных веществ Морошки обыкновенной, фармакологической активности вытяжек, использование Морошки обыкновенной в народной и официальной медицине; провести ГХ-МС анализ первичных метаболитов листьев *R. Chamaecrista*; проанализировать профили вторичных метаболитов в различных фракциях вытяжек листьев
5. Перечень графического материала (с точным указанием обязательных чертежей): таблиц – 10, рисунков – 11,

6. Консультанты разделов квалификационной работы

Раздел	Имя, ФАМИЛИЯ, должность консультанта	Подпись, дата	
		задание выдал	задание принял
1	Николай КОМИССАРЕНКО, ассистент заведения высшего образования кафедры кафедры фармакогнозии	28.09.2022	28.09.2022
2	Николай КОМИССАРЕНКО, ассистент заведения высшего образования кафедры кафедры фармакогнозии	02.12.2022	02.12.2022

7. Дата выдачи задания: «28» сентября 2022 года.

КАЛЕНДАРНЫЙ ПЛАН

№ з/п	Название этапов квалификационной работы	Срок выполнения этапов квалификационной работы	Примечание
1	Выбор темы. Анализ научных первоисточников	Сентябрь-декабрь 2022 г.	выполнено
2	Проведение экспериментальных исследований	Декабрь 2022 г.- март 2023 г.	выполнено
3	Оформление работы и подготовка к защите	Март - апрель 2023 г.	выполнено

Соискатель высшего образования

_____ Ал Хажж Хассан Зу Эл Фикар

Руководитель квалификационной работы

_____ Николай КОМИССАРЕНКО

ВИТЯГ З НАКАЗУ № 35
По Національному фармацевтичному університету
від 06 лютого 2023 року

нижченаведеним студентам 5-го курсу 2022-2023 навчального року, навчання за освітнім ступенем «магістр», галузь знань 22 охорона здоров'я, спеціальності 226 – фармація, промислова фармація, освітня програма – фармація, денна форма здобуття освіти (термін навчання 4 роки 10 місяців та 3 роки 10 місяців), які навчаються за контрактом, затвердити теми кваліфікаційних робіт:

Прізвище студента	Тема кваліфікаційної роботи	Посада, прізвище та ініціали керівника	Рецензент кваліфікаційної роботи	
• по кафедрі фармакогнозії				
Ал Хажж Хассан Зу Ел Фікар	Фітохімічне дослідження листя Морошки.	Phytochemical study of Moroshka leaves.	асистент Комісаренко М.А	професор Колісник С.В.

Підстава: подання декана, згода ректора

Ректор

Вірно. Секретар



ВИСНОВОК

**Комісії з академічної доброчесності про проведену експертизу
щодо академічного плагіату у кваліфікаційній роботі
здобувача вищої освіти**

№ 112708 від « 28 » квітня 2023 р.

Проаналізувавши випускну кваліфікаційну роботу за магістерським рівнем здобувача вищої освіти денної форми навчання Ал Хажж Хассан Зу Ел Фікар, 5 курсу, _____ групи, спеціальності 226 Фармація, промислова фармація, на тему: «Фітохімічне дослідження листя Моршки / Phytochemical study of Moroshka leaves _», Комісія з академічної доброчесності дійшла висновку, що робота, представлена до Екзаменаційної комісії для захисту, виконана самостійно і не містить елементів академічного плагіату (копіляції).

**Голова комісії,
професор**



Інна ВЛАДИМИРОВА

3%

27%

ОТЗЫВ

научного руководителя на квалификационную работу степени высшего образования магистр специальности 226 Фармация, промышленная фармация

Ал Хажж Хассан Зу Эл Фикар

на тему: «Фитохимическое изучение листьев Морошки».

Актуальность темы. Одной из ключевых задач современной фармации является поиск новых перспективных соединений - потенциальных лекарственных кандидатов. Природные объекты, особенно растительные, издавна являются богатыми источниками новых молекул и находят широкое применение в мировой пищевой и фармацевтической промышленности. Химический состав некоторых растений, обладающих полезными свойствами согласно данным этнофармакологии, исследован незначительно или совсем не изучен.

Одним из таких растений является Морошка обыкновенная (*Rubus chamaemorus* L.) из семейства Розоцветные (*Rosaceae*) известна широким применением плодов в пищевой промышленности. В северных странах Европы, странах Азии и Северной Америки плоды *R. chamaemorus* нашли широкое применение как противцинготное, мочегонное, потогонное и противовоспалительное средство. Но листья в отличие от плодов исследованы недостаточно.

Практическая ценность выводов, рекомендаций и их обоснованность.

Материал магистерской работы изложен последовательно и логично, вся использованная литература и экспериментальные данные умело обобщены.

Квалификационная работа посвящена проведению фитохимическому изучению листьев Морошки, проведению анализа основных показателей качества сырья.

Оценка работы. Материал квалификационной работы изложен методически правильно, последовательно, логично, что свидетельствует об умении автора анализировать научные первоисточники, применять методики анализа лекарственного растительного сырья, обобщать литературные и экспериментальные данные.

Общий вывод и рекомендации о допуске к защите. Полученные результаты исследований по актуальности, научному и практическому значению отвечают требованиям, предъявляемым к квалификационным работам, поэтому представленная работа может быть рекомендована к публичной защите в Экзаменационную комиссию Национального фармацевтического университета.

Научный руководитель _____ Николай КОМИССАРЕНКО

«05» апреля 2023 г.

РЕЦЕНЗИЯ

на квалификационную степени высшего образования магистр
специальности 226 Фармация, промышленная фармация

Ал Хажж Хассан Зу Эл Фикар

на тему: «Фитохимическое изучение листьев Морошки».

Актуальность темы. Плоды Морошки ранее изучались с целью установления содержания в них биологически активных веществ. Листья Морошки ранее не подвергались фитохимическому исследованию, хотя достаточно широко применяются в народной медицине многих стран. Учитывая, что листья *R. chamaemorus* вносят наибольший вклад в биомассу надземной части растения, их фитохимическое изучение является актуальной задачей.

Теоретический уровень работы. Соискателем высшего образования обработано большое количество научной литературы на достаточно высоком теоретическом уровне. Содержание работы полностью соответствует поставленной задаче. По теме работы опубликованы 1 тезисы доклада.

Предложения автора по теме исследования. В квалификационной работе автором проведено определение качественного состава и количественного содержания основных групп БАВ, компьютерный прогноз возможных видов биологической активности отдельных химических компонентов листьев Морошки.

Практическая ценность выводов, рекомендаций и их обоснованность. Полученные результаты имеют практическое и теоретическое значение, все

результаты обработаны статистически, информация структурирована и логически представлена.

Недостатки работы. Среди недостатков можно отметить неточные выражения, не влияющие на научную и практическую ценность работы.

Общий вывод и оценка работы. Материал квалификационной работы изложен последовательно и систематически, что указывает на умение автора применять выборочный анализ научных первоисточников и критически их обобщать. Квалификационная работа отвечает требованиям, предъявляемым к магистерским работам, и может быть представлена к защите в Экзаменационной комиссии Национального фармацевтического университета.

Рецензент _____

проф. Сергей КОЛЕСНИК

«11» апреля 2023 г.

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ**

**ВИТЯГ З ПРОТОКОЛУ №13
засідання кафедри фармакогнозії**

«19» квітня 2023 року

м. Харків

**засідання кафедри
фармакогнозії**

Голова: завідувач кафедри, канд. фарм. наук, доцент Мала О.С.

Секретар: канд. фарм. наук, ас. Комісаренко М. А

Присутні: зав. каф. доц. Мала О.С., проф. Ковальова А. М., проф. Гонтова Т.М., проф. Кошовий О.М., проф. Криворучко О.В., доц. Бородіна Н.В., доц. Демешко О.В., доц. Очкур О.В., доц. Машталер В.В., ас. Гончаров О.В., ас. Комісаренко М.А.

ПОРЯДОК ДЕННИЙ:

1. Представлення кваліфікаційних робіт до захисту в Екзаменаційній комісії НФаУ.

СЛУХАЛИ: Про представлення до захисту в Екзаменаційній комісії НФаУ кваліфікаційної роботи здобувача вищої освіти Ал Хажж Хассан Зу Ел Фікар на тему «Фітохімічне дослідження листя Морошки».

Науковий керівник : к.фарм.н., ас. Микола КОМІСАРЕНКО.

Рецензент: д.фарм.н., проф. Сергій КОЛІСНИК

В обговоренні кваліфікаційної роботи брали участь зав. каф. доц. Мала О.С., проф. Гонтова Т.М., проф. Кошовий О.М., проф. Криворучко О.В., доц. Машталер В.В., доц. Демешко О.В., ас. Гончаров О.В.

УХВАЛИЛИ: Рекомендувати до захисту у Екзаменаційній комісії НФаУ кваліфікаційну роботу здобувача вищої освіти Ал Хажж Хассан Зу Ел Фікар на тему «Фітохімічне дослідження листя Морошки», науковий керівник : к.фарм.н., ас. Микола КОМІСАРЕНКО.

Голова

Завідувачка кафедри фармакогнозії

Секретар

Ольга МАЛА

Микола КОМІСАРЕНКО

НАЦІОНАЛЬНИЙ ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

**ПОДАННЯ
ГОЛОВІ ЕКЗАМЕНАЦІЙНОЇ КОМІСІЇ
ЩОДО ЗАХИСТУ КВАЛІФІКАЦІЙНОЇ РОБОТИ**

Направляється здобувач вищої освіти Ал Хажж Хассан Зу Ел Фікар до захисту кваліфікаційної роботи за галуззю знань 22 Охорона здоров'я спеціальністю 226 Фармація, промислова фармація освітньою програмою Фармація на тему: «Фітохімічне дослідження листя Моршки».

Кваліфікаційна робота і рецензія додаються.

Декан факультету _____ / Світлана КАЛАЙЧЕВА /

Висновок керівника кваліфікаційної роботи

Здобувач вищої освіти Ал Хажж Хассан Зу Ел Фікар засвоїв основні методи фітохімічного аналізу, дана кваліфікаційна робота має практичне значення та відповідає вимогам, що висуваються до роботи певного рівня

Керівник кваліфікаційної роботи

_____ Микола КОМІСАРЕНКО

«05» квітня 2023 р.

Висновок кафедри про кваліфікаційну роботу

Кваліфікаційну роботу розглянуто. Здобувач вищої освіти Ал Хажж Хассан Зу Ел Фікар допускається до захисту даної кваліфікаційної роботи в Екзаменаційній комісії.

Завідувачка кафедри
фармакогнозії

_____ Ольга МАЛА

«19» квітня 2023 року

Квалификационную работу защищено
в Экзаменационной комиссии

« ____ » июня 2023 г.

С оценкой _____

Председатель Экзаменационной комиссии,
доктор фармацевтических наук, профессор

_____ / Олег ШПИЧАК /