АННОТАЦИЯ

диссертации на соискание степени доктора философии (PhD) по специальности 6D072100 – «Химическая технология органических веществ»

Шевченко Анастасия Сергеевна

«Разработка технологии комплексной переработки фармакопейных видов растений рода *Polygonum* L.»

Диссертационная работа посвящена разработке технологии получения сухих экстрактов из некоторых фармакопейных растений рода *Polygonum* L., обладающих каннабиноидной и опиодной биологической активностью.

Актуальность темы исследования

В связи с увеличением промышленных выбросов и ухудшением экологической обстановки увеличивается потребность в средствах улучшения здоровья. Одним из путей решения этой проблемы является использование лекарственных препаратов на растительной основе. А поскольку Казахстан является богатейшим регионом по разнообразию видов растений (более 6000 видов), то его малая изученность приводит к тому, что значительные объемы лекарственного сырья и фитопрепаратов импортируются из стран СНГ и дальнего зарубежья.

В настоящее время существует потребность здравоохранения и фармацевтической промышленности Республики Казахстан в новых, эффективных лекарственных средствах из растений местной флоры. Успешное решение этой проблемы будет способствовать реализации Программы развития фармацевтической и медицинской промышленности Республики Казахстан до 2025 года.

Правительство нашего государства взяло курс на насыщение отечественного фармацевтического рынка лекарственными средствами собственного производства и, в первую очередь, на основе местных (региональных) растительных ресурсов. К тому же Всемирная Организация Здравоохранения (ВОЗ) признает использование растений в качестве сырья для фармации как одно из самых приоритетных.

Республика Казахстан обладает богатейшими растительными ресурсами, но лишь малая их часть используется медициной и народным хозяйством. В настоящее время в мировой практике более 30% лекарственных средств производится из растений, при этом для лечения ряда заболеваний многие растительные средства оказываются незаменимыми.

В этом плане большой теоретический и практический интерес представляют дикорастущие растения семейства *Polygonaceae Juss.* (Гречишные), которые широко распространены в Казахстане. Изученные растения этого семейства обладают широким спектром биологической активности и используются для лечения различного рода воспалений, опухолей и других заболеваний.

В связи с этим, исследование химического состава новых дикорастущих видов семейства *Polygonaceae Juss*., разработка схем выделения потенциально биологически активных веществ, исследование биологической активности и разработка новых фитопрепаратов из дикорастущих казахстанских видов является актуальным и имеет социальное значение, поскольку позволит расширить ассортимент лекарственных средств РК, производимых из местного, возобновляемого растительного сырья.

Целью исследования является определение оптимальных параметров технологии выделения субстанций из растений рода *Polygonum* L., и их стандартизация.

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

1. Исследовать показатели качества изучаемых видов растений (*P. hydropiper, P. aviculare, P. minus*);
2. Установить качественный и количественный состав основных групп биологически активных веществ (БАВ) в исследуемых видах растений;
3. Разработать и установить оптимальные технологические параметры получения сухих экстрактов из исследуемых растений;
4. Составить лабораторный регламент выделения суммарных фитопрепаратов из исследуемых растений;
5. Для стандартизации субстанций разработать и составить оптимальные схемы разделения их комплексов БАВ на индивидуальные соединения и идентифицировать выделенные вещества.
6. Изучить новые виды активности выделенных веществ и фракций из сухих экстрактов для их применения в медицине.

Объект исследования – надземные части казахстанских фармакопейных видов растений рода *Polygonum* L. семейства *Polygonaceae* Juss (аптечные образцы): *Polygonum hydropiper* L., *Polygonum aviculare* L., *Polygonum minus* Huds.

Предмет исследования – надземные части трех фармакопейных казахстанских видов по нормативным показателям их качества (фармакопейные статьи) и количественного содержания действующих и сопутствующих веществ, выбор оптимальных экстрагентов, соотношения сырье: экстрагент, метод экстракции и времени экстракции. Биоскрининг полученных потенциальных фитопрепаратов проводили на тест-пробах для дальнейшей их рекомендации для применения.

Методы исследования. В качестве основных физико-химических методов исследования в работе использованы УФ-, ИК-спектроскопии, а также структуры всех выделенных веществ идентифицированы методами одномерной (^{1}H и ^{13}C ЯМР, DEPT), двумерной (HMQC, HMBC, COSY), масс- и хромато-масс спектрометрии.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

- сравнительный анализ качественного и количественного содержания основных групп БАВ надземных частей трех дикорастущих видов: *P. hydropiper*, *P. aviculare, P. minus* произрастающих на территории Республики Казахстан;
- описание технологии получения сухих экстрактов из надземных частей исследуемых растений рода *Polygonum* L.;
- разделение суммарных субстанций на индивидульные компоненты, с последующей спектральной идентификацией;
- результаты биологических тестов выделенных фракций и индивидуальных веществ для их дальнейшего ориентирования на внешний рынок.

Научная новизна.

1. Разработаны оригинальные методики спектрометрического количественного определения флавоноидов в надземных частях *P. hydropiper* и *P. aviculare*.
2. Установлен качественный и количественный состав основных групп биологически активных веществ (БАВ) в исследуемых видах растений;
3. Разработаны и установлены оптимальные технологические параметры получения сухих экстрактов из исследуемых растений;
4. Впервые составлены лабораторные регламенты выделения суммарных фитопрепаратов из исследуемых растений и и обоснована экономическая эффективность производства лекарственного препарата из *P. hydropiper*;
5. Для стандартизации субстанций, разработаны и составлены оптимальные схемы разделения их комплексов БАВ на индивидуальные соединения. Были выделены 10 флавоноидов, 2 жирные кислоты, 3 стерина, 1 фенолкарбоновая кислота, 3 сесквитерпена, 1 эфир жирной кислоты. Арахидоновая кислота и изополипиперовая кислота были выделены впервые из надземной части *P. hydropiper*.
6. Впервые были изучены противомалярийная, каннабиноидная и опиоидная виды активностей выделенных соединений и фракций из сухих экстрактов для их возможного применения в медицине.
7. Впервые изучена каннабиноидная активность 3,3’-диметилэллаговой кислоты.

Теоретическая значимость. Использование современных физико-химических методов анализа позволило получить новую информацию о химических составах некоторых фармакопейных растений рода *Polygonum* L. и

дать им количественную оценку. Разработанные методики качественного и количественного определения в сырье суммы флавоноидов могут использоваться для идентификации и оценки качества сырья. Результаты изучения каннабиноидной и опиодной активности могут быть использованы в дальнейших фармакологических исследованиях для расширения области применения сырья и препаратов на основе травы горца перечного.

Практическая значимость исследования связана с использованием местной флоры в качестве основного сырья для отечественной фармацевтической промышленности, а также расширением ассортимента лекарственных препаратов собственного производства из фармакопейного сырья, что в перспективе обеспечит внедрение препаратов в медицину. Практическое значение определится по результатам биоскрининга. Если сырье изначально фармакопейное, путь внедрения субстанций из такого сырья должен быть более коротким.

Основные результаты:

1. Результаты качественного группового и количественного анализа основных групп БАВ, а также элементного составов растений рода *Polygonum* L. и их фитопрепаратов. Качественный анализ трех растений показал, что групповой состав исследуемых растений рода *Polygonum* L. схож, однако количественная оценка показала расхожесть в результатах по содержанию основных групп БАВ. По количественному содержанию, полисахариды доминируют в надземной части *P. aviculare* (5.13%), дубильные вещества – в *P. hydropiper* (2.11%), флавоноиды - *P. aviculare* и *P. minus* (3.41% и 6.21%, соответственно), аминокислоты - *P. hydropiper* и *P. minus* (7.72% и 6.16%, соответственно). Также сырьё горцев содержит широкий спектр эссенциальных элементов (микроэлементов), включающих Zn, Ni, Cr, Cu, Mn, Co, Mg в зольных остатках после сжигания растительного материала (общая зола *P. hydropiper* – 12.68%, *P. aviculare* – 8.21%, *P. minus* – 10.32%). Можно отметить высокое содержание фосфора и марганца, что согласуется с их важной ролью в процессе биосинтеза продуктов первичного и вторичного метаболизма.

2. Стандартизированы методики спектрометрических методов определения флавоноидов. В качестве диагностической добавки применяли раствор хлорида алюминия. Максимум поглощения комплексов флавоноидов *P. hydropiper* наблюдается при λ_{max}=425 нм, *P. aviculare* – при λ_{max}=385 нм.

3. Изучено влияние природы экстрагента, гидромодуль, метод и продолжительность экстракции на выход экстрактивных веществ и флавоноидов.

В соответствии с результатами проведенных исследований в качестве экстрагента использовали 50% спирт этиловый – для *P. hydropiper* и *P. minus,* 70% спирт этиловый – для *P. aviculare*. Извлечения готовили в соотношении 1:7 - *P. hydropiper* и *P. minus,* 1:10 - *P. aviculare*. Степень измельчения сырья 3 мм – *P.*

hydropiper и *P. minus,* 1 мм - *P. aviculare*. Оптимальным методом экстракции для получения сухих биологически активных экстрактов из *P. hydropiper* и *P. minus* явился метод бисмацерации; для *P. aviculare* – перколяция. Для *P. hydropiper* установление динамического равновесия концентраций в системе твердое тело-жидкость наступает через 24 часа (ЭВ 23.77 %, флавоноды 2.85 %), для *P. aviculare* – через 12 часов (ЭВ 23.27 %, флавоноды 3.29 %), для *P. minus* – через 24 часа (ЭВ 22.84%, флавоноиды 3.35%) за первую экстракцию и через 6 часов для трех растений – за вторую экстракцию.

4. Впервые составлены оптимизированные технологические блок-схемы и материальные балансы процессов получения фитопрепаратов из трех фармакопейных растений (*P. hydropiper, P. aviculare, P. minus*). Выход фитопрепаратов по предложенным технологиям для *P. hydropiper* составила 25.25%, для *P. aviculare* – 23.95%, для *P. minus* – 24.73%. А также рассчитано экономическое обоснование промышленного производства сухого фитопрепарата из травы *P. hydropiper*. Так, себестоимость 100 грамм готовой продукции составит более 1500 тенге.

5. Были изучены липофильные фракции сухих экстрактов двух растений *(P. hydropiper* и *P. aviculare)* хромато-масс спектроскопическим методом. Так, из фракции выделенной из экстракта *P. hydropiper* по времени удерживания идентифицировали 29 липофильных веществ. Изоборнил-тиоцианоацетат (6.85%), 5,5-диметил-4 - [(1e) -3-метил-1,3-бутадиенил] -1-оксаспиро [2.5] октан (11.87%), 6,6,9a-триметил-4,5,5a, 6,7,8,9,9a-октагидронафто [1,2-C] фуран-1 (3H) -он (17.52%), фталевая кислота, бис (2-этилгексил) эфир (25.94%) обнаружены в наибольших концентрациях. Фракция *P. aviculare* РА-2-7 содержала 22 липофильных вещества, из них гептадекан (7.06%), октадекан (16.67%), тетракозан (12.75%) в наибольших концентрациях в пересчете на массу фракции.

6. Жирнокислотный составы трех растений (*P. hydropiper, P. aviculare, P. minus*) изучены методом газо-жидкостной хроматографии. В результате проведенного анализа идентифицированы 7 жирных кислот в составах *P. hydropiper* и *P. minus*, 5 жирных кислот – в *P. aviculare*. В составах *P. hydropiper* и *P. aviculare* преобладает каприловая кислота 8:0 в концентрациях 63.37% и 40.43%, соответственно; олеиновая – в *P. minus*. В меньших концентрациях в *P. hydropiper* содержатся пальмитиновая 16:0 (13.39%) и линолевая 18:2∆6 (7.48%) кислоты; в *P. aviculare* – линоленовая 18:3∆3 (20.40%) и пальмитиновая 16:0 (16.40%) кислоты; в *P. minus* – линолевая 18:2∆6 (52.20%) и пальмитиновая 16:0 (12.30%).

7. Используя различные варианты хроматографии и данные химических, физико-химических методов анализа выделены и установлены структуры 20 соединений: стеарил стерата, изополипиперовая кислота, 3, 3’-ди-О-метилэллаговая кислота, кверцетин, таксифолин, β-ситостерол, β-ситостирол-β-

D-глюкозид (даукостерол), фуегин, дендокарбин L, кверцитрин, изокверцитрин, 3-О-метиловый эфир кверцетина, изорамнетин, тамариксетин, мирицетин, линолевая и стеариновая кислоты. Арахидоновая кислота и изополипиперовая кислота были выделены впервые из надземной части *P. hydropiper*.

8. Изучены противомикробная, противомалярийная, опиоидная и каннабиноидная активности выделенных веществ и фракций из сухих экстрактов. Биоскрининговым исследованиям подвергнуты 7 экстрактов и 9 индивидуальных соединений. При чем опиоидная и каннабиноидная активности были изучены впервые для исследуемых видов. 3,3'-ди-О-метилэллаговая кислота и этанольный экстракт проявили хорошую моделирующую активность по отношению к CB1 рецепторам с 62.1 и 56.7% связывания соответственно. Этилацетатная фракция показала хорошую активность связывания с δ- подтипу опиоидных рецепторов (52.8%).

Оценка полноты решения поставленных задач. Поставленные задачи решены полностью, поскольку в работе исследованы показатели качества изучаемых видов растений (*P. hydropiper, P. aviculare, P. minus*), установлен качественный и количественный состав основных групп биологически активных веществ (БАВ) в исследуемых видах растений, разработаны и установлены оптимальные технологические параметры получения сухих экстрактов из исследуемых растений, составлен лабораторный регламент выделения суммарных фитопрепаратов из исследуемых растений, для стандартизации субстанций разработаны и составлены оптимальные схемы разделения их комплексов БАВ на индивидуальные соединения и идентифицированы выделенные вещества, изучить новые виды активности выделенных веществ и фракций из сухих экстрактов для их дальнейшего применения в медицине.

Разработка рекомендаций и исходных данных по конкретному использованию результатов. Полученные сухие фитопрепараты могут быть использованы в качестве лекарственных веществ, в частности в лечении пациентов с наркотической зависимостью.

Апробация практических результатов работы. Основные результаты диссертации докладывались и обсуждались на международных конференциях и форумах: Young generation forum, World Conference of Scientists and Engineers (WCSE) (Южная Корея, Сеул, 2016 г.), II Евразийском форуме молодых ученых "YES-Forum" при Фонде Первого Президента Республики Казахстан – Лидера Нации (Алматы, 2016 г.), VI Международная научно-практическая конференция «Лекарственное растениеводство: от опыта прошлого к современным технологиям» (Полтава, 2017 г.), XI Международная научная конференция «Инновационное развитие и востребованность науки в современном казахстане» (Алматы, 2017 г.).

Личный вклад автора заключается в выборе направления исследования, постановке целей и задач, экспериментальной работе, статистической обработке результатов и анализе полученных данных. Вклад автора является определяющим на всех этапах проводимого исследования. Автор принимал непосредственное участие в сборе и обработке литературных данных, выполнении экспериментальной части, анализе полученных результатов, их обсуждении, интерпретации и выводах, отработке технологии производства 3 суммарных фитопрепаратов широкого действия, разработанных в данной работе.

Связь темы с планом научно-исследовательских работ и различными государственными программами. Работа выполнялась в рамках Научно-технической программы МОН РК 2048/ГФ4 «Разработка универсальных экономически эффективных методов селективного выделения промышленно значимых классов биологически активных веществиз растений Казахстана» (№ госрегистрации 0115РК00563), сроки выполнения 2015-2017 гг.

Публикации по теме диссертации. По результатам диссертации опубликованы 9 научных работ, из них 3 статьи в изданиях из перечня, утвержденного Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК: 1 публикация в рейтинговом журнале «Chemistry of natural compounds» и 5 тезисов в материалах профильных международных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 148 страницах машинописного текста и включает введение, 3 раздела, заключение, 58 таблиц, 24 рисунок, список использованных источников из 262 наименований и 4 приложения.