

<https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-185-193>
УДК 615.072:615.322



Оригинальная статья / Research article

Индивидуальные соединения корневищ и корней родиолы четырехлепестной (*Rhodiola quadrifida*): выделение и установление структуры

А. В. Лёзина[✉], А. К. Уэйли, А. О. Уэйли, И. И. Тернинко

ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России), 197376, Россия, г. Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 14, лит. А

[✉] Контактное лицо: Лёзина Алёна Владимировна. E-mail: alena.lezina@pharminnotech.com

ORCID: А. В. Лёзина – <https://orcid.org/0000-0002-4738-8570>; А. К. Уэйли – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; А. О. Уэйли – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; И. И. Тернинко – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>.

Статья поступила: 06.09.2022

Статья принята в печать: 21.10.2022

Статья опубликована: 25.11.2022

Резюме

Введение. Лекарственное растительное сырье, содержащее в себе широкий спектр разнообразных биологически активных соединений, представляет значительный интерес как вероятный источник новых, фармакологически активных БАВ. Одним из перспективных растений является *Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. & C.A. Mey, поскольку в сырье отмечается наличие фенольных соединений и их производных, обуславливающих противовоспалительное, антиоксидантное и антиканцерогенное действие. Кроме того, данное растение, имеет значительную популярность в народной медицине в качестве БАД.

Цель. Выделение индивидуальных соединений из корневищ и корней родиолы четырехлепестной и последующее установление их структуры методами ЯМР и масс-спектрометрии для фитохимического профилирования.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали корневища и корни *Rh. quadrifida*, приобретенные в аптечной сети г. Санкт-Петербурга (место и время заготовки по информации на упаковке – Алтай (г. Барнаул), март 2019 года). Полученные в ходе последовательной жидкость-жидкостной экстракции фракции (этанольную, гексановую, бутанольную и водную) этанольного извлечения исследовали на приборе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с диодноматричным детектором SPD-M20A для определения хроматографического профиля. Наиболее перспективную этилацетатную фракцию очищали методами колоночной хроматографии на открытых стеклянных колонках с сорбентами различной селективности и препаративной хроматографии [Smartline (Knauer, Германия)]. Структуру полученных индивидуальных соединений устанавливали методом ЯМР (Bruker Avance III 400 MHz, Германия) и подтверждали масс-спектрометрией низкого разрешения [Flexar FX-15 (PerkinElmer, США)].

Результаты и обсуждение. В ходе исследования из корневищ и корней *Rhodiola quadrifida* было выделено 7 индивидуальных соединений, а именно: 3,4-дигидроксibenзойная кислота, 4-гидроксibenзойная кислота, кофейная кислота, этилгаллат, катехин, эпикатехин и тирозол. Данные соединения впервые выделены из сырья родиолы четырехлепестной. Они являются мажоритарными соединениями и могут характеризовать фитохимический профиль сырья, а также определять направления фармакологической активности.

Заключение. Впервые из сырья *Rhodiola quadrifida* выделено и методами ЯМР-спектроскопии и масс-спектрометрии доказано структуру 7 мажоритарных соединений, что может служить фундаментом для дальнейшего изучения этого вида родиолы и целевого изучения его фармакологической активности *in vitro* и *in vivo* с учетом индивидуального фитохимического профиля.

Ключевые слова: *Rhodiola quadrifida*, индивидуальные соединения, полифенолы, препаративная хроматография, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Вклад авторов. Все авторы участвовали в разработке дизайна эксперимента. Идея исследования принадлежит руководителю научной группы И. И. Тернинко. А. В. Лёзина и А. О. Уэйли выполняли экспериментальную часть по выделению индивидуальных соединений. Интерпретация результатов ЯМР-спектроскопического исследования была проведена А. К. Уэйли. Все авторы участвовали в обсуждении результатов и написании статьи.

Финансирование. Результаты работы получены с использованием оборудования ЦКП «Аналитический центр ФГБОУ ВО СПбХФУ Минздрава России» в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

Благодарность. Авторы выражают благодарность научному сотруднику ИЛ (ЦККЛС) к. фарм. н. Н. Ю. Сипкиной за помощь в получении масс-спектров.

Для цитирования: Лёзина А. В., Уэйли А. К., Уэйли А. О., Тернинко И. И. Индивидуальные соединения корневищ и корней родиолы четырехлепестной (*Rhodiola quadrifida*): выделение и установление структуры. Разработка и регистрация лекарственных средств. 2022;11(4):185–193. <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-185-193>

Individual Compounds of *Rhodiola quadrifida* Rhizomes and Roots: Isolating and Establishing Structure

Alyona V. Lezina[✉], Andrei K. Whaley, Anastasiia O. Whaley, Inna I. Terninko

Saint-Petersburg State Chemical-Pharmaceutical University, 14A, Prof. Popov str., Saint-Petersburg, 197376, Russia

[✉] Corresponding author: Alyona V. Lezina. E-mail: alena.lezina@pharminnotech.com

© Лёзина А. В., Уэйли А. К., Уэйли А. О., Тернинко И. И., 2022

© Lezina A. V., Whaley A. K., Whaley A. O., Terninko I. I., 2022

ORCID: Alyona V. Lezina – <https://orcid.org/0000-0002-4738-8570>; Andrei K. Whaley – <https://orcid.org/0000-0002-4847-5924>; Anastasiia O. Whaley – <https://orcid.org/0000-0003-4879-9336>; Inna I. Terninko – <https://orcid.org/0000-0002-2942-1015>.

Received: 06.09.2022 Revised: 21.10.2022 Published: 25.11.2022

Abstract

Introduction. Medicinal plant raw materials, containing a wide range of various biologically active compounds, are of considerable interest as a likely source of new, pharmacologically active biologically active substances. One of the promising plants is *Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. & C.A. Mey, since the raw materials contain phenolic compounds and their derivatives, which cause anti-inflammatory, antioxidant and anticarcinogenic effects. In addition, this plant has considerable popularity in folk medicine as a dietary supplement.

Aim. Isolation of individual compounds from rhizomes and roots of *Rhodiola quadrifida* and subsequent determination of their structure by NMR and mass spectrometry for phytochemical profiling.

Materials and methods. Rhizomes and roots of *Rhodiola quadrifida*, purchased in the pharmacy of St. Petersburg (place and time of procurement according to the information on the package – Altai (near Barnaul), in March 2019. The ethanol extract fractions (ethanol, hexane, butanol, and water) obtained during sequential liquid-liquid extraction were examined on a LC-20 Prominence instrument (Shimadzu, Japan) with an SPD-M20A diode array detector to determine the chromatographic profile. The most promising ethyl acetate fraction was purified by column chromatography on open glass columns with sorbents of different selectivity and preparative chromatography [Smartlina (Knauer, Germany)] with a spectrophotometric detector. The structure of the obtained individual compounds was determined by NMR (Bruker Avance III 400 MHz, Germany) and confirmed by low-resolution mass spectrometry [Flexar FX-15 (PerkinElmer, USA)].

Results and discussion. During the study, 7 individual compounds were isolated from the rhizomes and roots of *Rhodiola quadrifida*, namely 3,4-dihydroxybenzoic acid, 4-hydroxybenzoic acid, caffeic acid, ethyl gallate, catechin, epicatechin and tyrosol. These compounds were isolated for the first time from the raw materials of *Rhodiola quadrifida*. They are the major compounds and can characterize the phytochemical profile of raw materials, as well as determine the direction of pharmacological activity.

Conclusion. For the first time, *Rhodiola quadrifida* was isolated from raw materials and the structure of 7 majority compounds was proved by NMR spectroscopy and mass spectrometry, which can serve as a foundation for further study of this species of *Rhodiola* and targeted study of its pharmacological activity *in vitro* and *in vivo*, considering the individual phytochemical profile.

Keywords: *Rhodiola quadrifida*, individual compounds, polyphenols, preparative chromatography, NMR spectroscopy, mass spectrometry

Conflict of interest. The authors declare that they have no obvious and potential conflicts of interest related to the publication of this article.

Contribution of the authors. All authors participated in the design of the experiment. The idea of the study belongs to the head of the scientific group – I.I. Terninko. A.V. Lezina and A.O. Whaley performed the experimental part of isolating individual compounds. The interpretation of the results of the NMR spectroscopic study was carried out by A.K. Whaley. All authors participated in the discussion of the results and writing the article.

Funding. The results of the work were obtained using the equipment of the CCP "Analytical Center of the Federal State Budgetary Educational Institution of the Ministry of Health of the Russian Federation" under the agreement No. 075-15-2021-685 dated July 26, 2021 with the financial support of the Ministry of Education and Science of the Russian Federation.

Acknowledgment. The authors express their gratitude to the researcher of the research laboratory of the drug quality control center, Ph.D. N. Y. Sipkina for assistance in obtaining mass spectra.

For citation: Lezina A. V., Whaley A. K., Whaley A. O., Terninko I. I. Individual compounds of *Rhodiola quadrifida* rhizomes and roots: isolating and establishing structure. *Drug development & registration*. 2022;11(4):185–193. (In Russ.) <https://doi.org/10.33380/2305-2066-2022-11-4-185-193>

ВВЕДЕНИЕ

На современном этапе развития фармацевтической отрасли лекарственное растительное сырье (ЛРС) является одним из источников получения новых фармацевтических субстанций [1]. Это связано с увеличением доли растительных средств в ассортименте аптек и применением средств на растительной основе в народной медицине. Кроме того, разнонаправленный спектр биологически активных веществ (БАВ) в составе растений [2] создает предпосылки для поиска новых потенциальных активных фармацевтических ингредиентов. Однако недостаточная доказательность клинической эффективности комплексных растительных препаратов,

обусловленная отсутствием понятного механизма действия в ряду «структура – фармакологический ответ», а также поливалентностью различных химических соединений, ограничивает их применение в официальной медицине. Это создает предпосылки для маркирования фитохимического профиля ЛРС с целью их индивидуализации, что возможно за счет выделения основных соединений и установления их структуры. Значительная часть современных фитохимических исследований [3–5] имеют данную направленность.

Родиола четырехлепестная [*Rhodiola quadrifida* (Pall.) Fisch. & C.A. Mey] – многолетнее травянистое растение семейства Толстянковые (*Crassulaceae*), имеющее четко очерченный ареал произрастания,

ограниченной территорией Китая, Монголии, Тибета, Малой Азии и Западной Сибири [6, 7]. Сырье родиолы применяется в народной медицине в качестве противовоспалительного, гемостатического и тонизирующего средства в виде БАД [8, 9]. Данные о фитохимическом составе *R. quadrifida* в литературе ограничены. Сообщается [10] о наличии в сырье фенольных соединений: кверцетина, кемпферола, скополетина, умбелиферона и родоспещифичных тирозола и салидрозид. Японскими учеными М. Yoshikawa, Н. Shimada из метанольного экстракта были выделены родиоцианозиды А и В, родиофлавонозид и родиооктанозид и редкий флавоноид, характерный преимущественно для представителей семейства *Myrtaceae* – трицетин. Методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно связанной плазмой (АЭС-ИП) количественно установлен минеральный состав родиолы четырехлепестной [11]. Ранее нами методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии (ВЭТСХ) было доказано наличие синаповой, розмариновой и кофейной кислот [12]. Ограниченность данных о фитохимическом составе *R. quadrifida* в совокупности с популярностью данного растения в народной медицине позволяет позиционировать его в качестве целевого объекта для индивидуализации фитохимического профиля.

Цель работы – выделение индивидуальных соединений из корневищ и корней родиолы четырехлепестной и последующее установление их структуры методами ЯМР и масс-спектрометрии для фитохимического профилирования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служило воздушно-сухое ЛРС – корневища и корни родиолы четырехлепестной – приобретенные в аптечной сети г. Санкт-Петербурга в качестве БАД. Информация на упаковке и сертификате качества подтверждает соответствие заявленного вида и отражает место и время заготовки – Алтай (г. Барнаул), март 2019 года.

Точную навеску измельченного сырья (размер частиц 5–7 мм) массой 600 г помещали в экстрактор, извлечение проводили 70%-м этанолом [соотношение сырье:экстрагент (1:10)] методом мацерации при комнатной температуре 3 раза в течение 24 ч (общее время – 72 часа), каждый раз декантируя жидкость. Водно-спиртовые извлечения объединяли и упаривали в вакуумно-ротационном аппарате Hei-VAP Advantage (Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Германия) до водного остатка, а затем отстаивали в холодильнике 12 часов. Образовавшийся осадок отфильтровывали. Полученную водную вытяжку подвергали последовательной трехкратной жидкостно-жидкостной экстракции (соотношение водного извлечения и экстрагента 3:1) органическими растворителями (квалификация «х.ч.», АО «Вектон», Россия) различной полярности в делительной воронке: гекса-

ном, этилацетатом и *n*-бутанолом. Экстракцию жидким растворителем проводили в течение 10 минут.

В результате последовательной жидкость-жидкостной экстракции были получены 4 фракции: гексановая (ГФ), этилацетатная (ЭФ), бутанольная (БФ) и водная (ВФ). Все фракции уменьшали в объеме посредством концентрирования в вакууме до 100 мл.

Хроматографический профиль каждой фракции определяли аналитической высокоэффективной жидкостной хроматографией (ВЭЖХ) на хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония) с колонкой SUPELCO SIL™ LC-18, оснащенной диодно-матричным детектором SPD-M20A (Shimadzu, Япония). Условия хроматографирования представлены в таблице 1.

Таблица 1. Условия проведения высокоэффективной жидкостной хроматографии

Table 1. Conditions for high performance liquid chromatography

Колонка Column	250 × 4,6 мм, эндкепированный октадецилсилил (C18) силикагель для хроматографии, 5 мкм 250×4.6 mm, endcapped octadecylsilyl (C18) silica gel for chromatography, 5 μm
ПФ Mobile phase	Подвижная фаза А – деионизированная вода с добавлением трифторуксусной кислоты (ТФУ, Chemical Line, Россия) 0,1 %, (v/v). Подвижная фаза В – ацетонитрил класса «ВЭЖХ» (HPLC for UV/Gradient Grade (J.T. Baker, США) с добавлением ТФУ 0,1 %, (v/v) Mobile phase A is deionized water with the addition of trifluoroacetic acid (TFA, Chemical Line, Russia) 0.1 %, (v/v). Mobile phase B is HPLC grade acetonitrile (HPLC for UV/Gradient Grade (J.T. Baker, USA) with the addition of TFA 0.1 %, (v/v)
Способ элюирования Elution method	Градиентный режим: 0–5 мин 5 % В; 5–45,75 мин 100 % В; 45,75–50 мин 100 % В; 50–60 мин 5 % В; 60–65 мин 5 % В Gradient mode: 0–5 min 5 % B; 5–45.75 min 100 % B; 45.75–50 min 100 % B; 50–60 min 5 % B; 60–65 min 5 % B
Скорость потока, мл/мин Flow rate, ml/min	1
Температура колонки, °C Column temperature, °C	40 ± 1
Детектор Detector	Диодноматричный, λ = 235 нм Diode array, λ = 235 nm
Объем вводимой пробы, мкл The volume of input samples, μl	10
Время хроматографирования, мин Time chromatography, min	65

Проводили фракционирование наиболее перспективной ЭФ методом открытой колоночной хроматографии. Стеклоанную открытую колонку заполняли сорбентом Dianion® HP-20 (Supelco, Sigma-Aldrich, Япония), наносили ЭФ, после чего элюировали эта-

нолом с повышением концентрации от 10 до 50 % (шаг 10 %). Контроль очистки и разделения компонентов фракции проводили методом ТСХ [в системе *n*-бутанол:ледяная уксусная кислота:вода (4:1:2)] на пластинках HPTLC Silica gel 60 F254 plate (Merck KGaA, Германия). Подфракции со схожим компонентным составом (количество, цвет и R_f пятен) объединяли, упаривали на вакуумно-ротационном испарителе при 60 °С до 10 мл. Наиболее перспективные (количество пятен) полученные подфракции для дополнительной очистки наносили на колонку, заполненную сорбентом Sephadex™ LH-20 (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеция) и элюировали этанолом 96 %. Компонентный состав полученных очищенных подфракций изучали методом ТСХ в указанных выше условиях, подфракции с одинаковым числом компонентов – объединяли и упаривали. Очищенные подфракции подвергали хроматографическому разделению на хроматографе Smartline (Knauer, Германия), оборудованном спектрофотометрическим детектором, при длине волны 235 нм. Колонка для препаративной хроматографии – Kromasil C18 (25 см × 30 мм, с размером частиц 5 мкм). Скорость потока элюента 40 мл/мин. Подвижная фаза: вода деионизированная с содержанием ТФУ 0,1 %, (v/v) (компонент А) и ацетонитрил класса «ВЭЖХ» с содержанием ТФУ 0,1 %, (v/v) (компонент В). Элюирование проводили в градиентном режиме с 1 по 5 минут 5 % компонент В (изократический режим), с 5 по 40 минут 5–60 % В (линейный градиент), с 40 до 45 минуты 5 % В (изократический режим, приведение колонки в равновесие).

Коллекционирование фракций проводили вручную одновременно с выходом пика на хроматограмме. Контроль чистоты полученных соединений проводили с использованием системы аналитической ВЭЖХ. Полученные фракции выпаривали на вакуумно-ротационном испарителе при 60 °С до 5 мл, после чего замораживали и высушивали методом лиофильной сушки. Высушенные соединения перерастворяли в дейтерированном диметилсульфоксиде ($\text{DMSO-}d_6$, ООО «Кемикал Лайн», Россия).

Структуру выделенных соединений устанавливали на базе ресурсного центра Санкт-Петербургского государственного университета методами одномерной ЯМР-спектроскопии (Bruker Avance III 400 MHz, Германия), а также масс-спектрометрии низкого разрешения (96%-е этанольные растворы выделенных компонентов) на хромато-масс-спектрометре Flexar FX-15 (PerkinElmer, США) детектор масс-спектрометрический сингл квадрупольный, способ ионизации – электроспрей (ESI) в режиме сканирования SCAN в диапазоне масс 100–400, в положительной и отрицательной ионизации. Масс-спектрометрический анализ осуществляли на базе ЦКП «Аналитический центр» СПХФУ в рамках соглашения № 075-15-2021-685 от 26 июля 2021 года при финансовой поддержке Минобрнауки России.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Хроматографический профиль каждой фракции представлен на рисунке 1.

Согласно данным хроматограмм, приведенных на рисунке 1, наиболее перспективной оказалась ЭФ, по-

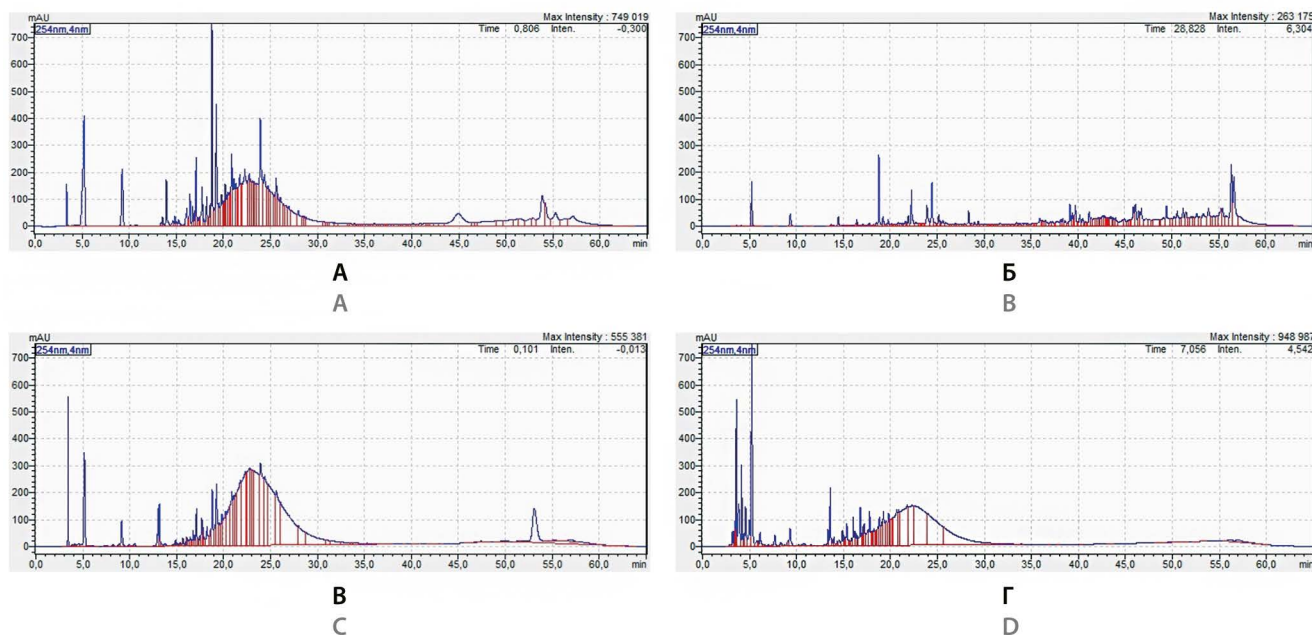


Рисунок 1. Результаты предварительного ВЭЖХ-анализа 4 фракций:

А – этилацетатная; Б – гексановая; В – *n*-бутанольная; Г – водная

Figure 1. Results of preliminary HPLC analysis of 4 fractions:

A – ethyl acetate; B – hexane; C – *n*-butanol; D – aqueous

сколько количество и интенсивность пиков веществ демонстрируют достаточное количество для очистки и дальнейшего выделения методом препаративной хроматографии. ГФ показала наибольшее количество пиков соединений, но их количественное содержание (по данным интенсивности без учета отклика детектора) было недостаточным для препаративного выделения.

В результате проведенного исследования было выделено **7** индивидуальных соединений. Результаты изучения ЯМР указанных веществ представлены в таблице 2.

Установлено, что соединение **1** является 3,4-дигидроксibenзойной кислотой (протокатеховая). На ¹H-ЯМР спектре 3,4-дигидроксibenзойной кислоты присутствовали шесть сигналов, три из которых соответствовали СН протонам бензойного кольца, образуя единую спиновую систему типа AMX, при δН 6.92 (1H, *d*, *J* = 8.0 Гц, H-5), 7.24 (1H, *d*, *J* = 1.9 Гц, H-2) и 7.27 (1H, *dd*, *J* = 8.0, 1.9 Гц, H-6). Остальные три сигнала в спектре относились к протонам OH групп двух фенольных гидроксильных при δН 9.53 (1H, *s*, OH-3) и 9.71 (1H, *s*, OH-4), а также к протону COOH группы при δН 10.10 (1H, *s*, COOH).

Соединение **2** было идентифицировано как 4-гидроксibenзойная кислота, поскольку на ¹H-ЯМР-спектре присутствовали четыре сигнала, два из которых соответствовали СН протонам бензойного кольца, образуя единую спиновую систему типа AA2XX2, при δН 6.83 (2H, *d*, *J* = 8.7 Гц, H-3, H-4) и 7.79 (2H, *d*, *J* = 8.7 Гц, H-2, H-6). Остальные два сигнала в спектре относились к протону OH группы фенольного гидроксильного при δН 10.21 (1H, *s*, OH-4) и к протону COOH группы при δН 12.38 (1H, *s*, COOH).

В ¹H-ЯМР-спектре соединения **3** присутствовали восемь сигналов, три из которых соответствовали СН протонам бензойного кольца, образуя единую спиновую систему типа AMX, при δН 6.76 (1H, *d*, *J* = 8.1 Гц, H-5), 7.02 (1H, *d*, *J* = 2.0 Гц, H-2) и 6.96 (1H, *dd*, *J* = 8.1, 2.0 Гц, H-6). Еще два СН протона образовывали спиновую систему типа AX при δН 6.17 (1H, *d*, *J* = 15.8 Гц, H-β) и 7.41 (1H, *d*, *J* = 15.8 Гц, H-α). Остальные сигналы спектра соответствовали двум протонам фенольных гидроксильных при δН 9.12 (1H, *s*, OH-3) и 9.52 (1H, *s*, OH-4), а также к протону COOH группы при δН 12.11 (1H, *brs*, COOH). Таким образом, соединение **3** было идентифицировано как кофейная кислота.

В ¹H-ЯМР-спектре соединения **4** присутствовали пять сигналов, соответствующие 10 протонам. В алифатической области спектра наблюдались сигналы протонов CH₃— и —CH₂— групп при δН 1.27 (3H, *t*, *J* = 7.1 Гц) и 4.21 (2H, *q*, *J* = 7.1 Гц), соответственно. Сигнал двух ароматических протонов наблюдался при δН 6.95 (2H, *s*, H-2, H-6). Остальные два сигнала относились к протонам фенольных гидроксильных при δН 8.91 (1H, *s*, OH-4) и 9.24 (2H, *s*, OH-3, OH-5). Согласно данным ЯМР-спектра, а также литературным данным, соединение **4** было идентифицировано как эти-

ловый эфир галловой кислоты – этилгаллат. Ранее методом ВЭТСХ в сырье родиолы четырехлепестной было установлено наличие галловой кислоты, что подтверждает правильность выводов.

Соединения **5** и **6** были идентифицированы как катехин и эпикатехин, соответственно. В ¹H-ЯМР-спектре катехина присутствовали тринадцать сигналов, соответствующие 13 протонам. В алифатической области спектра наблюдались сигналы протонов кольца C при δН 2.35 (1H, *dd*, *J* = 16.0, 8.1 Гц, H-4a), 2.66 (1H, *dd*, *J* = 16.0, 5.2 Гц, H-4b), 3.82 (1H, *m*, H-3) и 4.48 (1H, *d*, *J* = 7.6 Гц, H-2). В ароматической области наблюдались сигналы протонов кольца A, образуя спиновую систему типа AX, при δН 5.90 (1H, *d*, *J* = 2.2 Гц, H-6) и 5.69 (1H, *d*, *J* = 2.2 Гц, H-8) и протонов кольца B, образуя спиновую систему типа AMX, при δН 6.72 (1H, *d*, *J* = 1.8 Гц, H-22), 6.68 (1H, *d*, *J* = 8.0 Гц, H-52) и 6.59 (1H, *dd*, *J* = 8.0, 1.8 Гц, H-62). Остальные сигналы относились к протонам фенольных гидроксильных при δН 8.79 (1H, *s*, OH-32), 8.84 (1H, *s*, OH-42), 8.92 (1H, *s*, OH-7) и 9.16 (1H, *s*, OH-5).

В ¹H-ЯМР-спектре эпикатехина также присутствовали тринадцать сигналов, соответствующие 13 протонам. В алифатической области спектра наблюдались сигналы протонов кольца C при δН 2.48 (1H, *dd*, *J* = 16.5, 3.3 Гц, H-4a), 2.66 (1H, *dd*, *J* = 16.4, 4.3 Гц, H-4b), 4.01 (1H, *m*, H-3) и 4.74 (1H, *brs*, H-2). В ароматической области наблюдались сигналы протонов кольца A, образуя спиновую систему типа AX, при δН 5.90 (1H, *d*, *J* = 2.1 Гц, H-8) и 5.72 (1H, *d*, *J* = 2.1 Гц, H-6) и протонов кольца B, образуя спиновую систему типа AMX, при δН 6.90 (1H, *d*, *J* = 1.1 Гц, H-22), 6.66 (1H, *m*, H-52) и 6.66 (1H, *m*, H-62). Остальные сигналы относились к протонам фенольных гидроксильных при δН 8.80 (4H, *brs*, OH-32, OH-42, OH-7) и 9.10 (1H, *s*, OH-5).

Соединение **7** было идентифицировано как тирозол (ранее идентифицирован методом ВЭТСХ и ВЭЖХ). В ¹H-ЯМР-спектре присутствовали шесть сигналов, соответствующие 10 протонам. В алифатической области спектра наблюдались сигналы протонов двух CH₂ групп при δН 2.65 (2H, *t*, *J* = 7.3 Гц, H-7) и 3.56 (2H, *t*, *J* = 7.3 Гц, H-8), соответственно. Сигнал четырех ароматических протонов наблюдался при δН 6.71 (2H, *d*, *J* = 8.3 Гц, H-3, H-4) и 7.02 (2H, *d*, *J* = 8.3 Гц, H-2, H-6), образуя единую спиновую систему типа AA2XX2. Остальные два сигнала соответствовали алифатическому гидроксильному и фенольному гидроксильному при δН 4.56 (1H, *brs*) и 9.13 (1H, *brs*), соответственно.

Структуру выделенных соединений дополнительно подтверждали методом масс-спектрометрии. Характеристические ионы выделенных соединений приведены в таблице 3.

Данные соединения впервые выделены из сырья родиолы четырехлепестной. Они являются мажорными, характеризуют фитохимический профиль сырья и маркеры для стандартизации, а также определяют направления фармакологической активности.

Таблица 2. Результаты ЯМР выделенных индивидуальных соединений из сырья *Rhodiola quadrifida*
Table 2. NMR results of isolated compounds from raw materials *Rhodiola quadrifida*

Положение Position	Соединение 1 Compound 1	Соединение 2 Compound 2	Соединение 3 Compound 3	Соединение 4 Compound 4	Соединение 5 Compound 5	Соединение 6 Compound 6	Соединение 7 Compound 7
	δ H (J, Hz) δ H (J, Hz)	δ H (J, Hz) δ H (J, Hz)	δ H (J, Hz) δ H (J, Hz)	δ H (J, Hz) δ H (J, Hz)	δ H (J, Hz) δ H (J, Hz)	δ H (J, Hz) δ H (J, Hz)	δ H (J, Hz) δ H (J, Hz)
2	7.24 (1H, d, J = 1.9 Гц) 7.24 (1H, d, J = 1.9 Hz)	7.79 (2H, d, J = 8.7 Гц) 7.79 (2H, d, J = 8.7 Hz)	7.02 (1H, d, J = 2.0 Гц) 7.02 (1H, d, J = 2.0 Hz)	6.95 (2H, s)	-	-	7.02 (2H, d, J = 8.0 Гц) 7.02 (2H, d, J = 8.0 Hz)
3	-	6.83 (2H, d, J = 8.7 Гц) 6.83 (2H, d, J = 8.7 Hz)	-	-	-	-	6.71 (2H, d, J = 8.3 Гц) 6.71 (2H, d, J = 8.3 Hz)
4	-	6.83 (2H, d, J = 8.7 Гц) 6.83 (2H, d, J = 8.7 Hz)	-	-	-	-	6.71 (2H, d, J = 8.3 Гц) 6.71 (2H, d, J = 8.3 Hz)
5	6.92 (1H, d, J = 8.0 Гц) 6.92 (1H, d, J = 8.0 Hz)	-	6.76 (1H, d, J = 8.1 Гц) 6.76 (1H, d, J = 8.1 Hz)	-	-	-	-
6	7.27 (1H, dd, J = 8.0, 1.9 Гц) 7.27 (1H, dd, J = 8.0, 1.9 Hz)	7.79 (2H, d, J = 8.7 Гц) 7.79 (2H, d, J = 8.7 Hz)	6.96 (1H, dd, J = 8.1, 2.0 Гц) 6.96 (1H, dd, J = 8.1, 2.0 Hz)	6.95 (2H, s)	5.90 (1H, d, J = 2.2 Гц) 5.90 (1H, d, J = 2.2 Hz)	5.72 (1H, d, J = 2.1 Гц) 5.72 (1H, d, J = 2.1 Hz)	7.02 (2H, d, J = 8.3 Гц) 7.02 (2H, d, J = 8.3 Hz)
8	-	-	-	-	5.69 (1H, d, J = 2.2 Гц) 5.69 (1H, d, J = 2.2 Hz)	5.90 (1H, d, J = 2.1 Гц) 5.90 (1H, d, J = 2.1 Hz)	-
2'	-	-	-	-	6.72 (1H, d, J = 1.8 Гц) 6.72 (1H, d, J = 1.8 Hz)	6.90 (1H, d, J = 1.1 Гц) 6.90 (1H, d, J = 1.1 Hz)	-
5'	-	-	-	-	6.68 (1H, d, J = 8.0 Гц) 6.68 (1H, d, J = 8.0 Hz)	6.66 (1H, m)	-
6'	-	-	-	-	6.59 (1H, dd, J = 8.0, 1.8 Гц) 6.59 (1H, dd, J = 8.0, 1.8 Hz)	6.66 (1H, m)	-
3-OH	9.53 (1H, s)	-	9.12 (1H, s)	9.24 (2H, s)	-	-	-
4-OH	9.71 (1H, s)	10.21 (1H, s)	9.52 (1H, s)	8.91 (1H, s)	-	-	9.13 (1H, brs)
5-OH	-	-	-	9.24 (2H, s)	9.16 (1H, s)	9.10 (1H, s)	-
7-OH	-	-	-	-	8.92 (1H, s)	8.80 (4H, brs)	-
2'-OH	-	-	-	-	-	-	4.56 (1H, brs)
3'-OH	-	-	-	-	8.79 (1H, s)	8.80 (4H, brs)	-
4'-OH	-	-	-	-	8.84 (1H, s)	8.80 (4H, brs)	-
COOH	10.10 (1H, s)	12.38 (1H, s)	12.11 (1H, brs)	-	-	-	-
H- α	-	-	7.41 17 (1H, d, J = 15.8 Гц) 7.41 17 (1H, d, J = 15.8 Hz)	-	-	-	-

Окончание таблицы 2

Положение Position	Соединение 1 Compound 1	Соединение 2 Compound 2	Соединение 3 Compound 3	Соединение 4 Compound 4	Соединение 5 Compound 5	Соединение 6 Compound 6	Соединение 7 Compound 7
	δH (J в Гц) δH (J, Hz)	δH (J в Гц) δH (J, Hz)	δH (J в Гц) δH (J, Hz)	δH (J в Гц) δH (J, Hz)	δH (J в Гц) δH (J, Hz)	δH (J в Гц) δH (J, Hz)	δH (J в Гц) δH (J, Hz)
H- β	-	-	6.17 (1H, d, J = 15.8 Гц) 6.17 (1H, d, J = 15.8 Hz)	-	-	-	-
2H	-	-	-	4.21 (2H, q, J = 7.1 Гц) 4.21 (2H, q, J = 7.1 Hz)	-	-	-
3H	-	-	-	1.27 (t, J = 7.1 Гц) 1.27 (t, J = 7.1 Hz)	-	-	-
H-4a	-	-	-	-	2.35 (1H, dd, J = 16.0, 8.1 Гц) 2.35 (1H, dd, J = 16.0, 8.1 Hz)	2.48 (1H, dd, J = 16.5, 3.3 Гц) 2.48 (1H, dd, J = 16.5, 3.3 Hz)	-
H-4b	-	-	-	-	2.66 (1H, dd, J = 16.0, 5.2 Гц) 2.66 (1H, dd, J = 16.0, 5.2 Hz)	2.66 (1H, dd, J = 16.4, 4.3 Гц) 2.66 (1H, dd, J = 16.4, 4.3 Hz)	-
H-3	-	-	-	-	3.82 (1H, m)	4.01 (1H, m)	-
H-2	-	-	-	-	4.48 (1H, d, J = 7.6 Гц) 4.48 (1H, d, J = 7.6 Hz)	4.74 (1H, brs.)	-
H-7	-	-	-	-	-	-	2.65 (2H, t, J = 7.3 Гц) 2.65 (2H, t, J = 7.3 Hz)
H-8	-	-	-	-	-	-	3.56 (2H, t, J = 7.3 Гц) 3.56 (2H, t, J = 7.3 Hz)

Таблица 3. Результаты масс-спектрометрического анализа индивидуальных соединений *Rhodiola quadrifida*

Table 3. Results of mass spectrometric analysis of individual compounds of *Rhodiola quadrifida*

№	Структурная формула Structural formula	Химическое название (тривиальное название) Chemical name (trivial title)	Характеристические ионы Characteristic ions, m/z
1		3,4-дигидроксibenзойная (протокатеховая) кислота 3,4-dihydroxybenzoic (protocatechuic) acid	Молекулярный ион m/z 153 в отрицательной ионизации Molecular ion m/z 153 in negative ionization
2		4-гидроксibenзойная кислота 4-hydroxybenzoic acid	Молекулярный ион m/z 137 в отрицательной ионизации Molecular ion m/z 137 in negative ionization
3		3-(3,4-дигидроксифенил)-2-пропеновая (кофейная) кислота 3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-propenoic (caffeic) acid	Осколочные ионы m/z 179, 163, 164 в положительной ионизации Fragment ions m/z 179, 163, 164 in positive ionization
4		Этил 3,4,5-тригидроксibenзоат (этилгаллат/этиловый эфир галловой кислоты) Ethyl 3,4,5-trihydroxybenzoate (ethyl gallate/ethyl ester of gallic acid)	Осколочный ион m/z 125 в положительной ионизации Fragment ion m/z 125 in positive ionization
5		(2R, 3S)-2-(3',4'-дигидроксифенил)-3,4-дигидро-2H-хромен-3,5,7-триол(катехин) (2R, 3S)-2-(3',4'-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol (catechin)	Осколочный ион m/z 139 в положительной ионизации Fragment ion m/z 139 in positive ionization
6		(2R, 3R)-2-(3',4'-дигидроксифенил)-3,4-дигидро-2H-хромен-3,5,7-триол(эпикатехин) (2R, 3R)-2-(3',4'-dihydroxyphenyl)-3,4-dihydro-2H-chromene-3,5,7-triol(epicatechin)	Осколочный ион m/z 139 в положительной ионизации Fragment ion m/z 139 in positive ionization
7		4-(2-гидроксиэтил)фенол (тирозол) 4-(2-hydroxyethyl)phenol(tyrosol)	Осколочный ион m/z 179 в положительной ионизации Fragment ion m/z 179 in positive ionization

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые из корневищ и корней родиолы четырехлепестной выделены 7 веществ – протокатеховая, 4-гидроксibenзойная, кофейная кислоты, этилгаллат, катехин, эпикатехин, тирозол – структура которых была установлена методом ЯМР-спектроскопии и подтверждена масс-спектрометрией. Данные вещества можно отнести к мажоритарным и принять в качестве определяющих фитохимический профиль этого вида родиолы. Данные литературы [12] о наличии кофейной кислоты и тирозола в сырье *Rhodiola quadrifida* подтверждают результаты исследования.

Мажоритарное накопление предшественников дубильных веществ – катехина, эпикатехина, этилгаллата – дает возможность предположить превалирова-

ние данной группы БАВ в сырье родиолы четырехлепестной и рассматривать их в качестве маркеров при стандартизации комплексных препаратов на основе этого вида ЛРС.

Результаты исследования создают предпосылки для целевого изучения фармакологической активности сырья родиолы четырехлепестной с учетом биологического действия отдельных выделенных соединений.

ЛИТЕРАТУРА

1. Турышев А. Ю., Белоногова В. Д., Орлова А. А., Сидоров К. О., Скорнякова А. Ю. Лекарственная флора Среднего Урала – перспективный источник получения лекарственных средств. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4-1):32–36. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-32-36.

- Самбукова Т. В., Овчинников Б. В., Ганапольский В. П., Ятманов А. Н., Шабанов П. Д. Перспективы использования фитопрепаратов в современной фармакологии. *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*. 2017;15(2):56–63. DOI: 10.17816/RCF15256-63.
- Сайбель О. Л., Радимич А. И., Даргаева Т. Д., Лупанова И. А., Ферубко Е. В., Курманова Е. Н., Мартынич И. А. Фенольные соединения и фармакологический скрининг экстракта травы цикория обыкновенного. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(4):36–45. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-36-45
- Понкратова А. О., Уэйли А. К., Орлова А. А., Смирнов С. Н., Серебряков Е. Б., Лужанин В. Г. Выделение и установление структуры трех димерных проантоцианидинов типа А из надземной части *Empetrum nigrum* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2021;10(2):80–86. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-80-86
- Горяинов С. В., Ивлева В. А., Эспарса С., Писарев Д. И., Бакореза Г., Абрамович Р. А., Новиков О. О., Потанина О. Г., Лазар С., Хромов А. В., Бойко Н. Н. Технология выделения и анализ липофильных и гидрофильных биологически активных компонентов из семян *Nigella sativa* L. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2020;9(3):137–141. DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-137-141
- Khokhlova K. Authentication of *Rhodiola rosea*, *Rhodiola quadrifida* and *Rhodiola rosea* liquid extract from the Ukrainian market using HPTLC chromatographic profiles. *Natural Product Research*. 2020;34(19):2842–2846. DOI: 10.1080/14786419.2019.1591398.
- Tao H., Wu X., Cao J., Peng Y., Wang A., Pei J., Xiao J., Wang S., Wang Y. *Rhodiola* species: A comprehensive review of traditional use, phytochemistry, pharmacology, toxicity, and clinical study. *Medicinal Research Reviews*. 2019;39(5):1779–1850. DOI: 10.1002/med.21564.
- Li T., Zhang H. Application of microscopy in authentication of traditional Tibetan medicinal plants of five *Rhodiola* (Crassulaceae) alpine species by comparative anatomy and micromorphology. *Microscopy Research and Technique*. 2008;71(6):448–458. DOI: 10.1002/jemt.20570.
- Yoshikawa M., Shimada H., Matsuda H., Yamahara J., Murakami N. Bioactive constituents of Chinese natural medicines. I. New sesquiterpene ketones with vasorelaxant effect from Chinese moxa, the processed leaves of *Artemisia argyi* LEVL. et VANT.: moxartenone and moxartenolide. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1996;44(9):656–662. DOI: 10.1248/cpb.44.1656.
- Li T., Zhang H. Application of microscopy in authentication of traditional Tibetan medicinal plants of five *Rhodiola* (Crassulaceae) alpine species by comparative anatomy and micromorphology. *Microscopy Research and Technique*. 2008;71(6):448–458. DOI: 10.1002/jemt.20570.
- Тернинко И. И., Лёзина А. В., Генералова Ю. Э., Романова М. А. Анализ элементного состава отдельных видов *Sedum* (*Rhodiola*) spp. и *Orthilia secunda*. *Разработка и регистрация лекарственных средств*. 2022;11(1):132–139. DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-132-139.
- Лёзина А. В. Изучение отдельных классов фенилпропаноидов растений рода *Rhodiola* методом высокоэффективной тонкослойной хроматографии. В: Сборник материалов XI Всероссийской научной конференции студентов и аспирантов с международным участием «Молодая фармация – потенциал будущего». Санкт-Петербург: СПХФУ; 2021. С. 68–73.
- Saybel O. L., Radimich A. I., Dargaeva T. D., Lupanova I. A., Ferubko E. V., Kurmanova E. N., Martynchik I. A. Phenolic compounds and hepatoprotective activity of chicory herb extract. *Drug development & registration*. 2021;10(4):36–45. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-36-45.
- Ponkratova A. O., Whaley A. K., Orlova A. A., Smirnov S. N., Serebryakov E. B., Luzhanin V. G. Isolation and structure elucidation of three dimeric A-type proanthocyanidins from *Empetrum nigrum* L. *Drug development & registration*. 2021;10(2):80–86. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-2-80-86.
- Goryainov S. V., Esparza C., Ivlev V. A., Pisarev D. I., Bacorese G., Abramovich R. A., Novikov O. O., Potanina O. G., Lazar S., Khromov A. V., Boyko N. N. A Technology for isolation and analysis of lipophilic and hydrophilic biologically active components from *N. sativa* L. seeds. *Drug development & registration*. 2020;9(3):137–141. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2020-9-3-137-141.
- Khokhlova K. Authentication of *Rhodiola rosea*, *Rhodiola quadrifida* and *Rhodiola rosea* liquid extract from the Ukrainian market using HPTLC chromatographic profiles. *Natural Product Research*. 2020;34(19):2842–2846. DOI: 10.1080/14786419.2019.1591398.
- Tao H., Wu X., Cao J., Peng Y., Wang A., Pei J., Xiao J., Wang S., Wang Y. *Rhodiola* species: A comprehensive review of traditional use, phytochemistry, pharmacology, toxicity, and clinical study. *Medicinal Research Reviews*. 2019;39(5):1779–1850. DOI: 10.1002/med.21564.
- Li T., Zhang H. Application of microscopy in authentication of traditional Tibetan medicinal plants of five *Rhodiola* (Crassulaceae) alpine species by comparative anatomy and micromorphology. *Microscopy Research and Technique*. 2008;71(6):448–458. DOI: 10.1002/jemt.20570.
- Yoshikawa M., Shimada H., Matsuda H., Yamahara J., Murakami N. Bioactive constituents of Chinese natural medicines. I. New sesquiterpene ketones with vasorelaxant effect from Chinese moxa, the processed leaves of *Artemisia argyi* LEVL. et VANT.: moxartenone and moxartenolide. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 1996;44(9):656–662. DOI: 10.1248/cpb.44.1656.
- Li T., Zhang H. Application of microscopy in authentication of traditional Tibetan medicinal plants of five *Rhodiola* (Crassulaceae) alpine species by comparative anatomy and micromorphology. *Microscopy Research and Technique*. 2008;71(6):448–458. DOI: 10.1002/jemt.20570.
- Terninko I. I., Lezina A. V., Generalova Yu. E., Romanova M. A. Analysis of the elemental composition of individual Species *Sedum* (*Rhodiola*) spp. and *Orthilia secunda*. *Drug development & registration*. 2022;11(1):132–139. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2022-11-1-132-139.
- Lezina A. V. The study of individual classes of phenylpropanoids of plants of the genus *Rhodiola* by high performance thin layer chromatography. In: Collection of materials of the XI All-Russian scientific conference of students and graduate students with international participation "Young pharmacy – the potential of the future". St. Petersburg: SPHFU; 2021. P. 68–73.

REFERENCES

- Turyshv A. Y., Belonogova V. D., Orlova A. A., Sidorov K. O., Skornyakova A. Y. Medicinal flora of the Middle Urals – a prospective source of obtaining medicines. *Drug development & registration*. 2021;10(4):32–36. (In Russ.) DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4(1)-32-36.
- Sambukova T. V., Ovchinnikov B. V., Ganapol'sky V. P., Yatmanov A. N., Shabanov P. D. Prospects for phytopreparations (botanicals) use in modern pharmacology. *Reviews on Clinical Pharmacology and Drug Therapy*. 2017;15(2):56–63. (In Russ.) DOI: 10.17816/RCF15256-63.