

ԵՐԵՎԱՆԻ Մ. ՀԵՐԱՑՈՒ ԱՆՎԱՆ ՊԵՏԱԿԱՆ ԲԺՇԿԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

Գրետա Ռաֆայելի Ուլիխանյան

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԵՎ ԱՐՑԱԽԻ ՖԼՈՐԱՆԵՐՈՒՄ ՎԱՅՐԻ ԱՃՈՂ, ՀՈՂՈՒՄ ԵՎ
ՀԻԴՐՈՊՈՆԻԿ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ ԱՃԵՑՎՈՂ ՈՒՐՑԱԴԱՂՁ ՎԱՅՐԻ
ՌԵՀԱՆԱՈՒՐՑԱՆՄԱՆԻ (ZIZIPHORA CLINOPODIOIDES LAM.) ՀԵՏԱԶՈՏՈՒՄԸ
ԵՎ ՖԱՐՄԱԿՈԳՆՈՍՏԻԿ ԳՆԱՀԱՏՈՒՄԸ

ԺԵ.00.01 – «Դեղագիտություն» մասնագիտությամբ
կենսաբանական գիտությունների թեկնածուի
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

ՍԵՂՄԱԳԻՐ

ԵՐԵՎԱՆ - 2023

ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ М. ГЕРАЦИ

Улиханян Грета Рафаеловна

ИССЛЕДОВАНИЕ И ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА
ЗИЗИФОРЫ ПАХУЧКОВИДНОЙ (ZIZIPHORA CLINOPODIOIDES LAM.),
ДИКОРАСТУЩЕЙ ВО ФЛОРАХ АРМЕНИИ И АРЦАХА, ВЫРАЩЕННОЙ В ПОЧВЕ
И В УСЛОВИЯХ ГИДРОПОНИКИ

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

по специальности 15.00.01 – "Фармацевтика"

ЕРЕВАН – 2023

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի Մ. Հերացու անվան պետական բժշկական համալսարանում

Գիտական ղեկավար՝ ղեղագործական գիտությունների դոկտոր, պրոֆեսոր Ն.Բ. Չիչոյան

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝ Կ.գ.դ., պրոֆ. Ա.Ս. Հովհաննիսյան
դ.գ.թ., Մ.Մ. Փաշայան

Առաջատար կազմակերպություն՝ ՀՀ ԳԱԱ Մեջոյանի անվան նուրբ օրգանական քիմիայի ինստիտուտ

Ատենախոսության պաշտպանությունը կայանալու է 2023 թ. սեպտեմբերի 20-ին, ժամը 15⁰⁰-ին Երևանի Մ. Հերացու անվան պետական բժշկական համալսարանում գործող ՀՀ ԲՈՎ-ի 026 «Տեսական բժշկություն» մասնագիտական խորհրդի նիստում (0025, Երևան, Կորյունի 2): Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ԵՊԲՀ-ի գրադարանում: Սեղմագիրն առաքված է 2023թ. հուլիսի 7 -ին:

Մասնագիտական խորհրդի գիտական քարտուղար՝



Կ.գ.դ., պրոֆեսոր Ա.Ս. Տեր-Մարկոսյան

Тема диссертации утверждена в Ереванском государственном медицинском университете им. М. Гераци

Научный руководитель: доктор фармацевтических наук, профессор Н.Б. Чичоян

Официальные оппоненты: д.б.н. проф., А.С. Оганесян
к.ф.н., М.М. Пашаян

Ведущая организация: Научно-технологический центр органической и фармацевтической химии НАН РА

Защита диссертации состоится 20 сентября 2023г. в 15⁰⁰ часов на заседании специализированного совета 026 «Теоретическая медицина» ВАК РА при Ереванском государственном медицинском университете им. М.Гераци (0025, Ереван, ул. Корюна 2).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ЕГМУ им. М. Гераци. Автореферат разослан 7 июля 2023г.

Ученый секретарь специализированного совета



д.б.н., профессор А.С. Тер-Маркосян

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. За последнее десятилетие наиболее актуальной становится изучение лекарственного растительного сырья. Модернизация методов исследования лекарственных растений, применяемых в народной медицине, раскрывает новые перспективы для всестороннего изучения и более широкого применения растительных лекарственных препаратов. В последние годы на мировом рынке лекарств значительно возрос арсенал лекарственного растительного сырья и растительных препаратов. Растущий интерес к растительному сырью и препаратам растительного происхождения способствует обновлению и расширению их спектра научной применимости в медицинской практике, благодаря их системному и всестороннему научному изучению, и опыту, накопленному в практике народной медицины.

Возможности использования эфирномасличных растений при разработке новых лекарственных средств могут быть гораздо шире. Отечественная промышленность при производстве фитопрепаратов недостаточно использует богатство региональных сырьевых ресурсов эфирномасличных растений [Калинкина Г.И. и др., 2000].

Флора Кавказа отличается богатством, разнообразием и уникальностью видового состава, в которой большой интерес представляют растения семейства яснотковые (Lamiaceae), которые содержат такие биологически активные вещества (БАВ), как терпеноиды, гликозиды, полифенольные соединения и т.д. [Сидакова Т.М., 2012]. В этой номенклатуре особое место занимают эфирномасличное сырье и эфирномасличные препараты, которые применяются для лечения заболеваний сердца и сосудов, желудка, печени, почек, а также как антисептические и противовоспалительные средства, используемые для полосканий, ингаляций, и как корригент, улучшающий вкус и запах различных лекарственных препаратов [Галстян А.М., 1992; Вадалазова С.В., 2011].

Наряду с совершенствованием методов стандартизации, в центре внимания ученых в последние годы оказались представители рода *Ziziphora*, в частности, вид *Ziziphora clinopodioides* Lam., растущий в разных климатических зонах.

Род *Ziziphora* L. семейства губоцветных насчитывает около 30 видов, которые распространены в южной части Европы, в районе средиземноморья и юго-восточной Азии [Юзепчук С.В., 1954].

Изучение отечественного растительного сырья показывает, что флора Армении и флора Арцаха являются наиболее актуальными с точки зрения выявления перспективных эфирномасличных растений, и создания на их основе эффективных лекарственных препаратов. С этой точки зрения вид *Ziziphora clinopodioides* Lam. является одним из широко распространенных растений флоры Армении, а также флоры Арцаха [Chichoyan N.B. *et al.*, 2015].

Однако, комплексное изучение сырья зизифоры пахучковидной дикорастущей во флоре Армении и во флоре Арцаха и культивирование в почве и в условиях гидропоники не были проведены: не был изучен химический состав растительного сырья и отсутствовали нормативные документы, регламентирующие качество сырья.

Таким образом, становится актуальным выявление запасов дикорастущих популяций зизифоры в Армении и в Арцахе, изучение возможностей ее культивирования, комплексное исследование сырья из растений дикорастущих, выращенных в почве и в условиях гидропоники, модификация физико-химических методов стандартизации сырья и оценка биологической активности с дальнейшей разработкой нормативного документа.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования явилось комплексное фармакогностическое изучение и оценка биологической активности сырья *Ziziphora clinopodioides* Lam. дикорастущего во флоре Армении и Арцаха, выращенного в почве и в условиях гидропоники.

Были поставлены следующие задачи:

- определить товароведческие показатели качества сырья, собранного из дикорастущей зизифоры пахучковидной, выращенной в почве и в условиях гидропоники;
- изучить минеральный состав и оценить экологическую чистоту сырья, собранного из различных природно-климатических зон Армении и Арцаха, выращенного в почве и в условиях гидропоники; разработать новые подходы к методологии хемометрических исследований минерального состава и определить зависимость накопления БАВ от географического расположения местности сбора сырья и методов интродукции;
- классическими и современными физико-химическими методами исследования определить физические параметры и установить химический состав эфирных масел, полученных из сырья дикорастущих растений, выращенных в почве и в условиях гидропоники, и исследовать динамику накопления БАВ в различные стадии вегетации растения;
- разработать новые методы стандартизации сырья и модифицировать методику количественного определения суммы флавоноидов;
- исследовать биологическую (антимикробную, антиоксидантную) активность эфирных масел и экстрактов, полученных из сырья зизифоры, дикорастущей и выращенной в условиях гидропоники.

Научная новизна. В рамках диссертационной работы установлены анатомо-диагностические признаки сырья и определены товароведческие показатели, регламентирующие качество сырья зизифоры флоры Армении и Арцаха, выращенного в почве и в условиях открытой гидропоники.

Впервые, с использованием хемометрической методологии, выявлена зависимость накопления макро-, микроэлементов и БАВ от высоты произрастания растения над уровнем моря и методов интродукции. Установлена экологическая чистота сырья, на основании которой сырье предложено как геохимический индикатор.

Установлен химический состав эфирных масел, полученных из сырья дикорастущей и культивированной зизифоры, и впервые определены индексы Ковача для качественной идентификации алканов (C₁₀-C₁₅). Определена динамика накопления БАВ в сырье, в зависимости от фазы вегетации растения. Предложены новые методы стандартизации сырья для определения веществ фенольной природы (флавоида-апигенина и фенилпропаноида- вербаскозида).

Впервые для стандартизации сырья была разработана модифицированная методика количественного определения суммы флавоноидов, в пересчете на флавоноид 7-метил судажитин, для которого было получено значение удельного показателя поглощения.

Выявлена антиоксидантная активность экстрактов и антимикробная активность эфирных масел зизифоры дикорастущей и выращенной в условиях гидропоники. **Научно-практическая значимость.** Проведенные физико-химические и биологические исследования позволяют рекомендовать сырье в качестве перспективного источника эфирного масла и веществ фенольной природы.

Разработанные физико-химические методы исследования могут применяться в практике стандартизации сырья по фенольным соединениям, с применением маркеров:

флавоноида – апигенина и фенилпропаноида – вербаскозида.

Разработанная модифицированная методика для определения суммы флавоноидов может быть использована для оценки качества сырья (Патент №3223А, 03.09.2018).

Результаты хемометрических подходов к исследованию можно использовать в качестве информационного материала для стандартов условий интродукции и сбора сырья.

Результаты математического моделирования и разработанные методики могут использоваться в качестве методических рекомендаций в области стандартизации лекарственного растительного сырья.

Апробация материалов диссертации. Основные результаты работы докладывались и обсуждались на научных конференциях:

- VI международная конференция «Современные аспекты реабилитации в медицине», (Ереван-Дилижан, 2013);
- Ежегодная отчетная научная конференция, Ереванский государственный медицинский университет им. Мхитара Гераци, (Ереван 2013);
- Ежегодная отчетная научная конференция, посвященная 50-летию основания НИЦ, ЕГМУ им. Мхитара Гераци, (Ереван 2014);
- International conference on «Biochemistry and molecular biology», (Paris, France, 2015);
- Международная конференция, посвященная 10-летию со дня основания Национального бюро экспертиз НАН РА, «Применение современных научных методов и технологий в области экспертиз», (Ереван-Цахкадзор 2015);
- International conference «Current issues of medical science» dedicated to the 95th anniversary of the Yerevan State Medical University after M. Heratsi, (Yerevan, 2015);
- Գիտական համաժողով «Գիտական հետազոտությունների համագործակցության եզրեր», Մ. Հերացու անվան ԵՊԲՀ, (Երևան-Ծաղկաձոր 2015);
- VI Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы науки XXI века», (Москва 2016);
- VIII Международная конференция, «Современные аспекты реабилитации в медицине», (Ереван (РА), Степанакерт (НКР), 13 - 15 сентября, 2017);
- Scientific Conference «YSMU, Scientific week 2017», (Yerevan, Armenia, November 27-December 1, 2017);
- International congress «19th Congress of the european section of the international society of toxinology», (Yerevan, Armenia, 22-26 September, 2018);
- Հայաստանի 5-րդ միջազգային բժշկական համագումար «Հայաստան - սփյուռք - Արցախ միաձուլումի փառս առողջության», (Երևան, Հայաստան, 4-6 հուլիսի, 2019);
- Scientific Conference «Drug Development: from Design to Customer» DDDC 2019, (Yerevan, Armenia, 23-25 September, 2019).

Научные публикации по диссертационной теме отражены в 16 научных публикациях (10 статей и 6 тезисов), в том числе в журналах международной научной базы Thomson Reuters (1статья и 1тезис). Получен патент (№3223А, 03.09.2018).

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 108 страницах и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, главы результатов исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложений. В диссертацию включены 26 таблиц, 29 рисунков, 2 диаграммы. Список литературы состоит из 161 источника, в том числе 155 иностранных авторов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалом исследования послужили надземные части дикорастущего вида зизифоры пахучковидной (*Ziziphora clinopodioides* Lam.), собранные в фазе цветения в апреле-июле 2013-2018 гг. с горных районов Армении, из окрестностей сел Вохчаберд, Анкаван, Арзакан; и с горных районов Арцаха, из окрестностей сел – Суренаван, Бердадзор, Нахиджеваник, а также растений, выращенных в условиях гидропоники (черный шлак) и в почве. В целях культивирования кустики зизифоры, собранные в районе деревни Вохчаберд Котайкской области, в середине апреля (12.04.13), были высажены в безземельных вегетативных условиях открытой гидропоники, а также в почве (чернозем) [Давтян Г.С., 1980]. Сбор и сушку проводили согласно указаниям ВОЗ [WHO GACP, 2003]. Растения флоры Армении и Арцаха были гербаризированы, получены ваучеры ERE 194583 и ERE N201407 соответственно. Гербарии хранятся в гербарном депозитарии Института ботаники имени А.Л. Тахтаджяна НАН РА.

Для осуществления поставленной цели и решения выдвинутых задач исследования, были применены товароведческие, фитохимические, физикохимические и биологические методы исследования.

Результаты исследования были обработаны методами математической статистики с применением пакета прикладных программ MS «Excel 2010», «SPSS»® для Windows (Version 19.0, Chicago, IL, USA) и программы «Biostat» [Лобочкая Н.Л., Морозов Ю.В., Дунаев А.А., 1987, Лях Ю.Е. и др., 2006]. Применялись хемометрические подходы для широкой оценки данных содержания элементов, такие как корреляционный анализ (КА), анализ главных компонентов (АГК) и иерархический кластерный анализ (ИКА). ИКА проводился методом Уорда для анализа различий в составе элементов в образцах зизифоры. Метод кластеризации Уорда был применен к квадрату евклидова расстояния в качестве меры [Гланц С., 1999, Петри А.К., Сэбин К., 2003, Хуея Zhang *et al.*, 2015].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Ресурсоведческие исследования сырья *Ziziphora clinopodioides* Lam..

Проведенные ресурсоведческие исследования запасов сырья комплексно-экспедиционным методом (15.04.13-20.05.13) в нескольких районах Армении и Арцаха показали, что сырьевые ресурсы дикорастущего вида зизифоры пахучковидной в природе ограничены и в основном встречаются в виде небольших полукустарничков в малых популяциях, которые занимают площадь от 1000 – до 2000м², где плотность популяции составляет приблизительно 3±0.2 (куст/м²).

Анатомо-диагностические признаки сырья зизифоры пахучковидной, дикорастущей, выращенной в почве и в условиях гидропоники.

В результате проведенных макро- и микроскопических исследований установлена подлинность растительного сырья: впервые были определены анатомо-диагностические признаки (эфирномасличные железки, характерные железистые головчатые волоски, кольцеобразные сосуды) травы зизифоры дикорастущей, выращенной в почве и в условиях гидропоники.

Все собранные образцы сырья, независимо от природно-климатических условий произрастания и особенностей интродукции, гистологически идентичны и, культивируя растение, можно поддерживать уровень анатомических особенностей вида.

Числовые показатели качества сырья.

С целью определения подлинности, чистоты и доброкачественности сырья в рамках предварительной стандартизации были изучены числовые показатели качества сырья зизифоры дикорастущей, выращенной в почве и в условиях гидропоники. Результаты исследования показали, что наиболее высокое содержание экстрактивных веществ наблюдается в сырье, собранном в Арзакане, на высоте 1700м над уровнем моря. Наибольшее количество эфирного масла накапливалось в сырье дикорастущих растений, собранных в окрестностях села Нахиджеваник. Для культивированных растений наибольшее количество эфирного масла наблюдалось для сырья из гидропоники, что свидетельствует о благоприятном влиянии условия выращивания (черный шлак) на динамику накопления эфирного масла: в условиях гидропоники можно получить ценное эфирномасличное сырье (табл.1).

Таблица 1.

Числовые показатели качества сырья, собранного из различных регионов Армении и Арцаха (% в пересчете на абсолютно сухое сырье) (n=5, P*≥ 0,05, P≤0,001), $\bar{x} \pm E_s$.

Образцы сырья	Влажность, %	Зола, %	Сумма экстрактивных веществ (50 % спирт),%	Выход эфирного масла, %
Гидропоника (черный шлак)	8.618±0.067 P ₂ ,P ₃ ,P ₄ ,P ₅ ,P ₆ ,P ₇ , P ₈	9.011±0.135 P ₂ ,P ₃ ,P ₄ ,P ₅ ,P ₆ ,P ₇ , P ₈	22.557±0.176 P ₂ ,P ₃ ,P ₄ ,P ₅ ,P ₆ ,P ₇ , P ₈	1.25±0.011 P ₂ ,P ₃ , P ₄ ,P ₅ ,P ₆ ,P ₇ , P ₈
Почвенная культура	8.38±0.101 P ₁ ,P ₃ , P* ₄ ,P ₅ ,P ₆ ,P ₇ , P ₈	10.958±0.054 P ₁ ,P ₃ ,P ₄ ,P ₅ ,P ₆ ,P ₇ , P ₈	22.49±1.241 P ₁ ,P ₃ ,P ₄ ,P ₅ ,P ₆ ,P ₇ , P ₈	0.138 ±0.007 P ₁ ,P ₃ , P ₄ ,P ₅ ,P ₆ ,P ₇ , P ₈
Вохчаберт	7.787±0.186 P ₁ ,P ₂ , P ₄ ,P ₅ ,P ₆ ,P ₇ , P ₈	7.798±0.096 P ₁ ,P ₂ , P ₄ ,P ₅ ,P ₆ ,P ₇ , P ₈	25.206±0.722 P ₁ ,P ₂ , P ₄ ,P ₅ ,P ₆ ,P ₇ , P ₈	0.848±0.014 P ₁ ,P ₂ , P ₄ ,P ₅ ,P ₆ ,P ₇ , P ₈
Анкаван	8.384±0.119 P ₁ ,P* ₂ , P ₃ ,P ₅ ,P ₆ ,P ₇ , P ₈	7.054±0.12 P ₁ ,P ₂ , P ₃ ,P ₅ ,P* ₆ ,P ₇ , P ₈	23.459±0.372 P ₁ ,P ₂ , P ₃ ,P ₅ ,P ₆ ,P ₇ , P ₈	0.794±0.005 P ₁ ,P ₂ , P ₃ ,P ₅ ,P ₆ ,P ₇ , P ₈
Арзакан	8.816±0.074 P ₁ ,P ₂ , P ₃ ,P ₄ ,P ₆ ,P ₇ , P ₈	8.047±0.142 P ₁ ,P ₂ , P ₃ ,P ₄ ,P ₆ ,P ₇ , P ₈	28.656±0.406 P ₁ ,P ₂ , P ₃ ,P ₄ ,P ₆ ,P ₇ , P ₈	0.788±0.016 P ₁ ,P ₂ , P ₃ ,P ₄ ,P ₆ ,P ₇ , P ₈
Нахиджеваник	8.998±0.098 P ₁ ,P ₂ , P ₃ ,P ₄ ,P ₅ ,P* ₇ , P ₈	7.03±0.116 P ₁ ,P ₂ , P ₃ ,P* ₄ ,P ₅ ,P ₇ , P ₈	14.331±0.205 P ₁ ,P ₂ , P ₃ ,P ₄ ,P ₅ ,P ₇ , P ₈	1.064±0.063 P ₁ ,P ₂ , P ₃ ,P ₄ ,P ₅ ,P ₇ , P ₈
Суренаван	9.076±0.048 P ₁ ,P ₂ , P ₃ ,P ₄ ,P ₅ ,P* ₆ , P ₈	8.759±0.257 P ₁ ,P ₂ , P ₃ ,P ₄ ,P ₅ ,P ₆ , P ₈	18.65±0.31 P ₁ ,P ₂ , P ₃ ,P ₄ ,P ₅ ,P ₆ , P ₈	1.002±0.034 P ₁ ,P ₂ , P ₃ ,P ₄ ,P ₅ ,P ₆ , P* ₈
Бердазор	9.247±0.077 P ₁ ,P ₂ , P ₃ ,P ₄ ,P ₅ ,P ₆ , P ₇	7.423±0.223 P ₁ ,P ₂ , P ₃ ,P ₄ ,P ₅ ,P ₆ , P ₇	12.087±0.243 P ₁ ,P ₂ , P ₃ ,P ₄ ,P ₅ ,P ₆ , P ₇	1.012±0.032 P ₁ ,P ₂ , P ₃ ,P ₄ ,P ₅ ,P ₆ , P* ₇

P₁ - относительно к экземплярам из гидропоники, P₂ - относительно к экземплярам почвенной культуры, P₃ - относительно к экземплярам из Вохчаберта, P₄ - относительно к экземплярам из Анкавана, P₅ - относительно к экземплярам из Арзакана, P₆ - относительно к экземплярам из Нахиджеваника, P₇ - относительно к экземплярам из Суренавана, P₈ - относительно к экземплярам из Бердазора.

По результатам исследования были установлены числовые показатели качества сырья зизифоры: оптимальная измельченность сырья составляет 0,5-1 мм, экстрагент – спирт этиловый 50%, влажность не более 9,25%, зола общая не более 10,96%, сумма экстрактивных веществ не менее 12,09%, выход эфирного масла для сырья из

культивируемых растений не менее 0,14% и для сырья дикорастущих растений - не менее 0,79%.

Минеральный состав. Макроэлементный и микроэлементный состав сырья.

Результаты термоэмиссионного спектрального анализа показали, что сырье, собранное из различных регионов Армении и Арцаха и из растений, культивируемых в почве и в условиях гидропоники, является экологически чистым и богато биогенными элементами: среди них 4 макроэлемента (Ca, K, Na, Mg), которые составляют подавляющую массу золы 75,78%, и 5 микроэлементов (Cu, Mn, Fe, Al, Si), 3 ультрамикроэлемента (V, Ti, Ni), в том числе 7 эссенциальных (Na, Ca, Mg, Fe, Cu, Mo, Mn) и 5 условно эссенциальных элементов (Si, Ti, V, Ni, Al).

Результаты исследования показали, что в составе всех исследуемых образцов не обнаружено содержание Pb, As и Cd, а количество тяжелых металлов (Fe, Cu, Mo, Mn, Ni, V, Ti) находится в пределах норм, регулируемых Сан ПиН РФ 2.3.2 1078-01, что свидетельствует об экологической чистоте сырья [Quality control methods for herbal materials. WHO, 2011].

Корреляционный анализ между элементами, содержащихся в сырье.

Методом корреляционного анализа были выявлены взаимосвязи между аккумулярованием элементов в сырье зизифоры. Результаты корреляционного анализа представлены в матрице 13 элементов, показывающей корреляции от умеренной до сильной для всех элементов, включенных в исследование (табл.2).

Таблица 2.

Корреляционная матрица концентраций элементов в сырье зизифоры:

	Ca	K	Mn	Mg	Na	Fe	Al	Mo	Si	Ti	Cu	V	Ni
Ca	1,000												
K	0,841**	1,000											
Mn	0,588**	0,763**	1,000										
Mg	0,865**	0,843**	0,637**	1,000									
Na	0,842**	0,893**	0,749**	0,782**	1,000								
Fe	0,354*	0,391**	0,501**	0,399**	0,182	1,000							
Al	0,746**	0,805**	0,845**	0,780**	0,810**	0,162	1,000						
Mo	-0,447**	-0,546**	-0,396**	-0,406**	-0,715**	0,338*	-0,565**	1,000					
Si	0,716**	0,707**	0,779**	0,534**	0,699**	0,540**	0,638**	-0,268	1,000				
Ti	-0,143	-0,062	0,376*	-0,301*	0,143	-0,288	0,282	-0,332*	0,341*	1,000			
Cu	-0,889**	-0,825**	-0,590**	-0,700**	-0,843**	-0,440**	-0,587**	0,328*	-0,807**	0,074	1,000		
V	-0,901**	-0,842**	-0,610**	-0,714**	-0,842**	-0,460**	-0,610**	0,326*	-0,818**	0,074	0,998**	1,000	
Ni	0,089	-0,266	-0,326*	-0,096	-0,256	-0,414**	0,074	0,071	-0,132	0,089	0,197	0,179	1,000

* Корреляция значима на уровне 0,05, $p \leq 0,05$ (двусторонняя).

** Корреляция значима на уровне 0,01, $p \leq 0,01$ (двусторонняя).

*** $p > 0,05$ статистическая недостоверность отмеченных различий.

Высокая корреляция была обнаружена между следующими элементами: K, Na, Mg с Ca, где коэффициенты корреляции составили 0,841, 0,842 и 0,865 соответственно, а между Mg, Na с K - составили 0,843 и 0,893, и между Cu с V-0,998. Высокая отрицательная корреляция была обнаружена между Na, Ca с Cu, где коэффициенты корреляции составили -0,843 и -0,889 соответственно.

Между K, Na, Ca с V коэффициенты корреляции составили -0,842 и -0,901 соответственно.

Кроме того, наиболее сильная корреляция наблюдалась между Mg с Ca, Na с K

(к.к.=0,865 и к.к.=0,893 соответственно). Наиболее сильную отрицательную корреляцию имеет Са с Си и V (к.к.=-0,889 и к.к.=-0,901 соответственно).

Анализ главных компонент.

АГК показал сходство и корреляцию между двумя типами изменчивости элементов. Элементы с высокими нагрузками сильно повлияли на группировку и разделение образцов, а элементы с небольшой нагрузкой слабо повлияли на группировку и разделение образцов. Нагрузки и оценки главных компонент (ГК) с вращением варимакс показаны на рисунке. Были извлечены первые четыре главных компонента, которые составили 91.93% от общей изменчивости среди 13 переменных, где, а и б иллюстрируют график нагрузки и график оценки (рис.1 а, б).

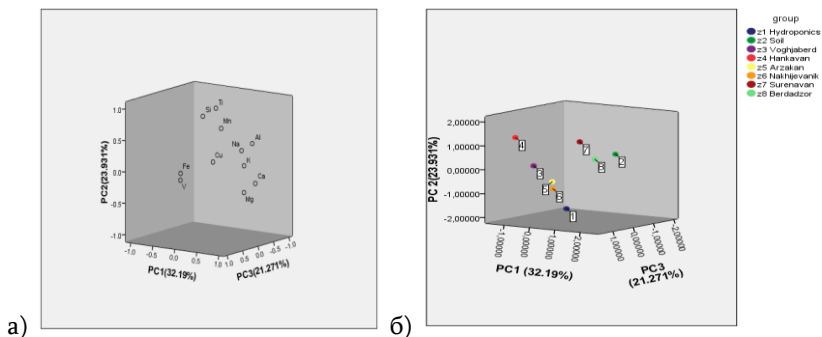


Рис. 1. Анализ главных компонент; (а) график нагрузки, (б) график оценки групп.

На рис. 1а показан график нагрузки ГК 1 по сравнению с ГК 2 и ГК 3, где Mg, K, Al и Ca преобладали в более высоких положительных значениях в ГК 1 и составили 32,19% общей дисперсии. Na был включен в нагрузку изменчивости ГК 1, но отрицательно коррелировал с Fe и Cu в ГК 4. Значительная корреляция между двумя или более элементами указывает на аналогичную способность элементов накапливаться в сырье, обусловленная идентичным типом почв и условиями интродукции.

Иерархический кластерный анализ.

По результатам ИКА были получены 3 группы, как показано на дендрограмме (рис.2). Эти группы были классифицированы следующим образом: группа 1, образцы 1,5 и 6; группа 2, образцы 3,4,7 и 8; группа 3, образец 2.

Dendrogram using Ward Method

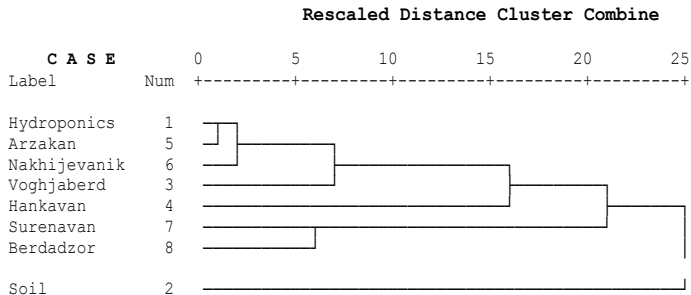


Рис. 2. Дендрограмма с использованием метода Уорда. Иерархический кластерный анализ концентраций элементов на основе 13 переменных в сырье.

С учетом географического расположения местностей, было обнаружено, что классификация образцов была аналогична географическому расположению над уровнем моря. Хемометрический анализ показал, что изменчивость элементов в исследуемых образцах, а также способность растения накапливать БАВ, зависят от высоты местности произрастания над уровнем моря и условий интродукции. Хемометрические подходы к исследованию предоставляют информацию не только о распределении и метаболизме веществ в сырье на пространственном уровне и в зависимости от условий интродукции, но и о хемотаксономии растения, которая может служить индикатором данного вида.

Физические параметры эфирных масел.

В рамках товароведческого анализа, по международным инструкциям (WHO, 2011), в процессе определения числовых показателей качества эфирномасличного сырья, важны такие физико-химические параметры, как показатель преломления, относительная плотность, которые свидетельствуют о доброкачественности масла и своевременности сбора сырья. Как показывают результаты исследования, наибольшее количество эфирного масла накапливается в сырье, собранном из села Нахиджеваник (табл.1), однако, относительная плотность этого масла была меньше плотностей остальных эфирных масел, что свидетельствует о малом количестве кислородсодержащих терпенов [Муравьева Д.А. и др., 2002]. По наибольшему значению относительной плотности отличались эфирные масла из сырья, собранного из сел Бердадзор и Суренаван (рис.3).

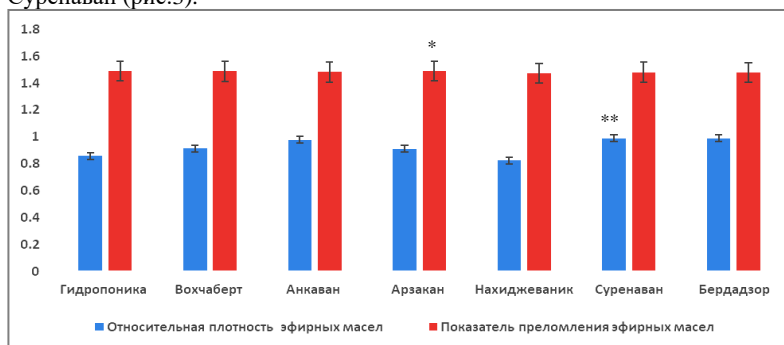


Рис. 3. Физико-химические показатели эфирных масел, полученных из зизифоры.

* $P \geq 0,05$, P^* - относительно к экземплярам из гидропоники, P^{**} - относительно к экземплярам из Суренавана.

Результаты проведенных исследований показали, что для всех эфирных масел значения показателей преломления находятся в пределах 1,474-1,489. Полученные нами данные показывают, что различия между значениями показателя преломления и относительной плотности эфирного масла, свидетельствуют о влиянии некоторых факторов (природно-климатические, онтогенетические, интродукция и т.д.) на состав эфирного масла и на содержащихся в нем монотерпенов, сесквитерпенов и их кислородных производных.

Химический состав эфирных масел.

Методом газо-жидкостной хромато-масс-спектрометрии были изучены эфирные масла зизифоры из шести популяций горностепных поясов флоры Армении и Арцаха, а также, выращенных в условиях гидропоники. Результаты исследования показали, что во всех образцах эфирных масел идентифицированы более 60 терпеновых соединений.

Химический состав доминантных компонентов, исследуемых образцов эфирных масел зизифоры, представлены на рисунке. Основными компонентами во всех 7-и экземплярах являются монотерпены и их кислородные производные: (\pm) пулегон, вербенон, эвкалиптол, D (\pm) лимонен, тимол, β -пинен. По результатам исследования, в эфирном масле растения, выращенном в условиях гидропоники, преобладают бициклические монотерпены (камфен, пинен, сабинен) и сесквитерпен D-гермакрен, которые отсутствуют в эфирных маслах, полученных из дикорастущих растений, однако в эфирном масле сырья из гидропоники, отсутствуют I-ментон, D-ментон и DL (\pm) ментол. Также, результаты исследования показали, что для образцов дикорастущей зизифоры существует обратная взаимосвязь между накоплением лимонена с пулегоном и изоментомом; по мере уменьшения лимонена возрастает содержание пулегона и изоментона (рис.4).

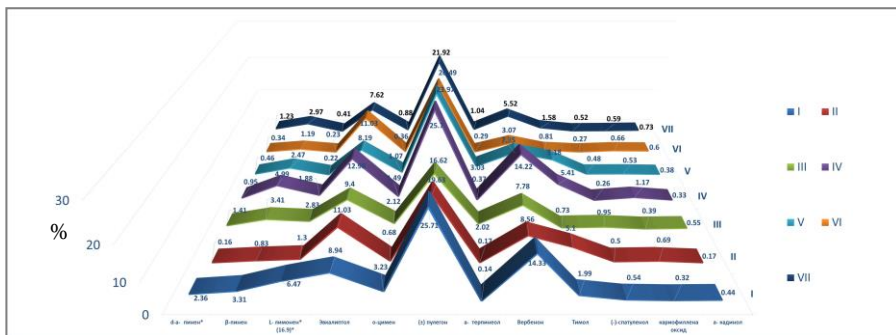


Рис. 4. Химический состав доминантных компонентов, исследуемых образцов эфирных масел зизифоры по данным ГЖХ-МС: **I**-Гидропоника; **II**-Вохчаберд; **III**-Анкаван; **IV**-Арзакан; **V**-Нахиджеваник; **VI**- Суренаван; **VII**- Бердадзор.

На основании полученных экспериментальных данных хроматографирования n -алканов (C_{10} – C_{15}) для доминантных компонентов были определены индексы Ковача и получена линейная зависимость времен удерживания от индексов Ковача (где x -индексы Ковача; y - время удерживания; средний коэффициент корреляции $R=0.978$) (рис.5).

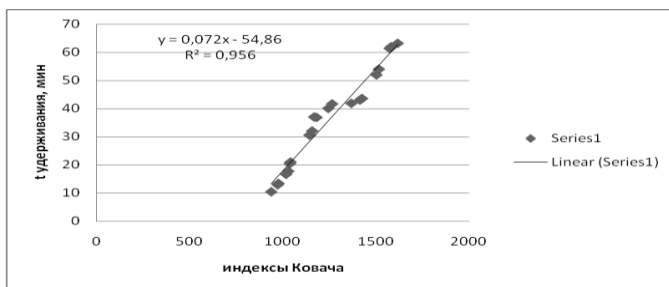


Рис. 5. Зависимость времен удерживания n -алканов (C_{10} – C_{15}) от индексов Ковача для эфирных масел, полученных из сырья зизифоры дикорастущей и выращенной в условиях гидропоники.

Таким образом, эфирные масла зизифоры из шести популяций горностепных поясов флоры Армении и Арцаха, а также, выращенных в условиях гидропоники, как по качественному, так и по количественному содержанию основных компонентов близки. Некоторые количественные и качественные различия компонентов обусловлены не только климатическими условиями произрастания, но и условиями выращивания. Полученные данные могут быть использованы для создания хроматографической базы, с целью дальнейшей идентификации, стандартизации и установления подлинности эфирных масел из сырья зизифоры.

Физические параметры и состав эфирных масел в зависимости от фазы вегетации растения.

Изучение физических параметров эфирных масел, полученных из сырья, собранного до цветения и в фазе цветения растений (с. Анкаван), показало, что относительная плотность эфирного масла зизифоры, собранной в фазе цветения больше, чем для эфирного масла растений, собранных до цветения. Увеличение значения относительной плотности в период цветения свидетельствует о качественном и количественном изменении терпеновых соединений и их кислородных производных. Определен химический состав исследуемых образцов эфирных масел, собранных в фазе цветения и до цветения (диагр. 1).

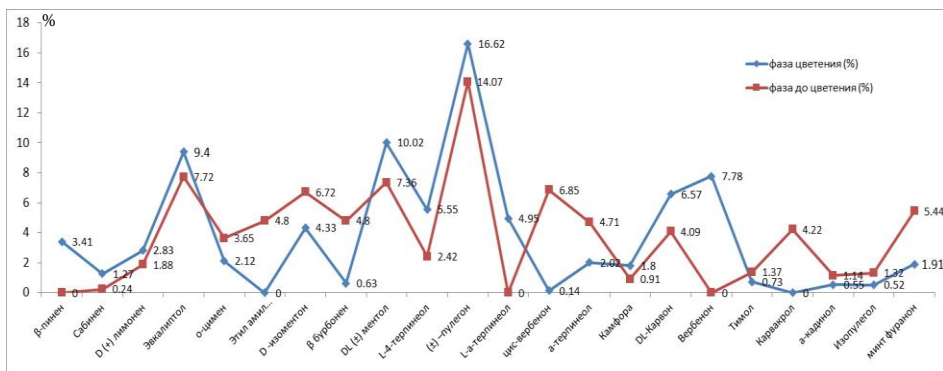


Диаграмма 1. Динамика накопления некоторых терпеновых соединений в эфирных маслах растений, собранных в фазе цветения и до цветения.

Как показывают результаты исследования, терпеновые соединения в эфирных маслах качественно и количественно отличаются в зависимости от фазы цветения, что также подтверждается литературными данными [Сидакова Т.М., 2012].

Результаты исследования также показали, что в эфирном масле, полученном из сырья, собранном в фазе цветения, накапливаются вербенон, D-ментон, β-пинен, 1R-α-пинен, которые отсутствуют в эфирных маслах, полученных из сырья, собранного до цветения. Было установлено, что максимальное накопление представляющих интерес терпеновых соединений и их кислородных производных (эвкалиптол, вербенон, DL±ментол), наблюдается в период цветения, что можно учитывать в процессе заготовки сырья.

Стандартизация сырья по флавоноидам.

С целью создания проекта научно-технической документации (НТД) для сырья зизифоры была проведена разработка методики стандартизации по флавоноидам.

Для стандартизации сырья зизифоры была разработана модифицированная методика количественного определения суммы флавоноидов в различных образцах сырья. Было получено значение удельного показателя поглощения $E_{1\text{см}}^{1\%}$ для флавоноида 7-метил судакхитина (Sigma-aldrich), $E_{1\text{см}}^{1\%} = 920,0 \pm 2,34$. Были получены спектры поглощения водно-спиртовых экстрактов сырья зизифоры регионов Армении и Арцаха, выращенных в почве и в условиях гидропоники. В зависимости от местности заготовки сырья и условий выращивания, рассчитаны значения суммы флавоноидов в пересчете на стандарт 7-метил судакхитин. Методика определения содержания суммы флавоноидов в абсолютно сухом сырье зизифоры пахучковидной в пересчете на 7-метил судакхитин была запатентована (Патент № 3223 А, от 03.09.2018).

Было установлено, что содержание суммы флавоноидов в пересчете на 7-метил судакхитин, колеблется от 2,61% до 4,18 %. Показано, что растение может накапливать значительное суммарное количество флавоноидов до 4,18 % (рис.6).

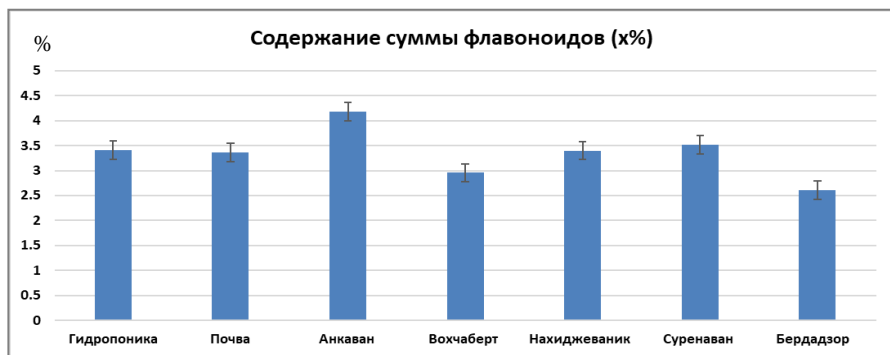


Рис. 6. Сумма флавоноидов экстрактов сырья зизифоры в пересчете на 7-метил судакхитин ($P \leq 0,001$).

Результаты исследования показали, что различия в количественном содержании флавоноидов обусловлены не только климатическими факторами, но и условиями выращивания. Разработанный метод является доступным и эффективно может применяться в области стандартизации лакарственного растительного сырья по флавоноидам.

Стандартизация сырья по фенольным соединениям.

Была проведена предварительная стандартизация сырья по фенольным соединениям, учитывая, что в составе сырья, кроме флавоноидов, содержатся также фенилпропаноиды, фенолокислоты и т.д.

Во всех образцах с помощью ВЭЖХ удалось качественно и количественно идентифицировать фенольные соединения: флавоноид-апигенин, фенил-пропаноидный гликозид-вербаскозид (рис. 7,8).

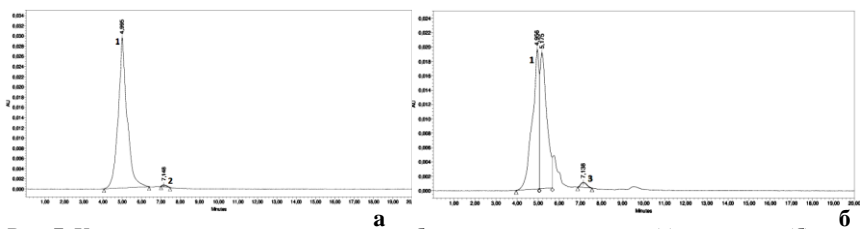


Рис. 7. Хроматограмма экстрактов сырья, собранного из гидропоники (а) и из почвы (б): вербаскозид (1), апигенин (2,3).

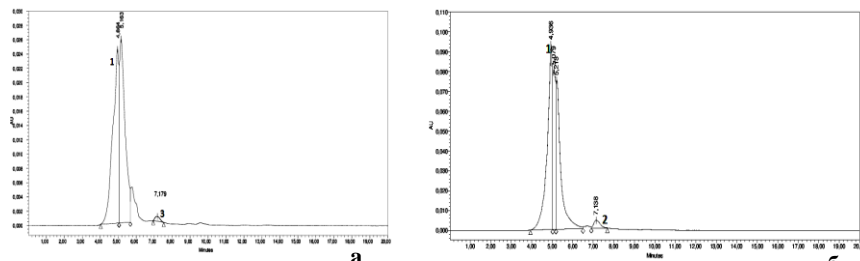


Рис. 8. Хроматограмма экстрактов сырья, собранного из Вохчаберта (а) и Суранавана (б): вербаскозид (1), апигенин (2,3).

Антиоксидантная активность экстрактов.

Для выявления сравнительной антиоксидантной активности (АОА) сырья зизифоры дикорастущей во флоре Армении и Арцаха, и выращенной в условиях гидропоники, использовали спектрофотометрический метод, при котором исследовалось поглощение света при взаимодействии природных антиоксидантов (АО) со стабильным хромоген-радикалом ДФПГ (2,2-дифенил-1-пикрилгидразил, $C_{18}H_{12}N_5O_6$, $M=394.33$) (рис.9).

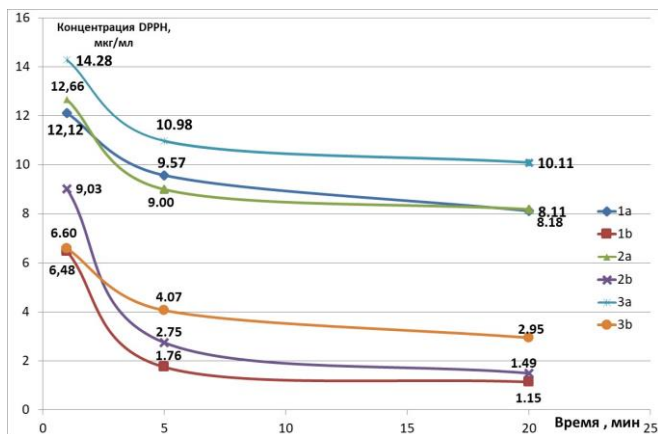


Рис. 9. Взаимосвязь оптической плотности (D) и концентрации (C) ДФПГ; 1.Бердадор, 2. Вохчаберд, 3. Гидропоника: а-6мг, б-12мг.

Результаты исследования показали, что экстракты сырья, собранных из гидропоники и из сел Вохчаберт (Армения) и Бердадзор (Арцах), проявляют выраженную АОА, отличаясь друг от друга по скорости проявления реакции. Также рассчитана концентрация (IC₅₀) антиоксиданта, вызывающего 50% ингибирование радикалов ДФПГ. Наиболее высокую АОА проявляют экстракты из сырья, собранного из Бердадзора. Наибольшее значение IC₅₀ имел экстракт из сырья, собранного из гидропоники при концентрации бмг, для которого значение антиоксидантной активности было наименьшим.

Антимикробная активность эфирных масел.

Результаты исследования антимикробной активности эфирных масел зизифоры флоры Арцаха (Суренаван) и выращенной в условиях гидропоники показали, что эфирные масла из сырья, собранного из Суренавана и из гидропоники, проявляют сравнительно выраженную антимикробную активность против *Staphylococcus aureus* MDC 5233, *Enterococcus faecalis* MDC 5254, *Bacillus subtilis* MDC 1820, *Streptococcus faecalis* MDC 5242, *Mycobacterium spp.* MDC 5237, *Bacillus coagulans* MDC 1906. Исследуемые эфирные масла своей антимикробной активностью незначительно отличаются от активности бензилпенициллина и цефтриаксона, а в некоторых случаях, в частности, в случае штаммов *Staphylococcus aureus* MDC 5233, *Streptococcus faecalis* MDC 5242 и *Mycobacterium spp.* MDC 5237, даже незначительно превосходят, образуя более выраженную зону ингибирования роста (табл.3).

Таблица 3.

Антимикробная активность эфирных масел из зизифоры, дикопрорастающей в Суренаване и выращенной в условиях гидропоники (n=5).

Название штамма	Диаметр зоны ингибирования роста мм (диаметр диска d=5мм.), $\bar{x} \pm E_s$			
	1	2	3	4
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>, MDC 5249	-	7.08 ±0.086	-	-
<i>Mycobacterium spp.</i> , MDC 5237	20.44 ±0.458	9 ±0.158	15.08±0.124	15.06 ±0.121
<i>Bacillus subtilis</i>, MDC 1820	15.04 ±0.172	12.12 ±0.128	14 ±0.141	30.94 ±0.266
<i>Streptococcus faecalis</i>, MDC 5242	18.02 ±0.128	30.14 ±0.225	10.06 0.157	20.1 ±0.274
<i>Bacillus coagulans</i>, MDC 1906	8.1 ±0.182	10.12 ±0.222	16.04 ±0.15	19.8 ±0.228
<i>Enterococcus faecalis</i>, MDC 5254	11.98 ±0.296	13.96 ±0.256	12 ±0.272	33.02 ±0.215
<i>Serratia marcescens</i>, MDC 5251	6.94 ±0.163	9.14 ±0.194	-	-
<i>Escherichia coli</i>, MDC 5002	7.08 ±0.163	9.04 ±0.144	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>, MDC 5233	25 ±0.179	28.14 ±0.254	19.02±0.193	20.06 ±0.108

1. Эфирное масло зизифоры, дикопрорастающей в Суренаване. 2. Эфирное масло зизифоры, выращенной в условиях гидропоники. 3. Бензилпенициллин. 4. Цефтриаксон.

Эфирное масло сырья из гидропоники проявляет практически идентичное антимикробное действие по сравнению с эфирным маслом, полученным из дикорастущей зизифоры, что позволит в дальнейшем с точки зрения сохранения ресурсов дикорастущего растения, предложить применение сырья культивированного растения в медико-фармацевтической практике.

Таким образом, использование классических и современных физико-химических методов для исследования сырья зизифоры флоры Армении и Арцаха, выращенного в почве и в условиях гидропоники, приобретает научно-практическую ценность не только о химическом составе и биологической активности сырья эндемического растения, но и для дальнейшего использования в области стандартизации лекарственного растительного сырья.

ВЫВОДЫ

1. Во флоре Армении и Арцаха в рамках ресурсоведческого анализа были выявлены популяции зизифоры: плотность сырьевых запасов составила приблизительно 3 ± 0.2 (куст/м²). Установлены анатомо-диагностические признаки и числовые показатели качества сырья: влажность не более 9.25%, общая зола не более 10.96%, сумма экстрактивных веществ не менее 12.09%, выход эфирного масла для сырья дикорастущих растений - не менее 0.79%, а для сырья из культивированных растений - не менее 0.14%.
2. Определен минеральный состав и оценена экологическая чистота сырья зизифоры, дикорастущей и выращенной в почве и в условиях гидропоники. Показано, что сырье зизифоры является не только источником минеральных элементов, но и геохимическим индикатором. В рамках хемометрического анализа была выявлена корреляционная связь между группами образцов, идентичными по минеральному составу, аккумулярованием эфирного масла и БАВ (пулегон, апигенин, вербаскозид), в зависимости от высоты произрастания и условий интродукции.
3. Установлены физические параметры (относительная плотность, показатель преломления) эфирных масел сырья. Показано, что при своевременности заготовки сырья значения показателей преломления эфирных масел находятся в пределах 1.474–1.489. Выявлена зависимость физико-химических параметров эфирного масла от фазы вегетации растения.
4. В эфирных маслах сырья идентифицировано 60 и более компонентов, в которых доминировали пулегон, вербенон, эвкалиптол, DL(±) ментол. Для 22 доминирующих компонентов были установлены индексы Ковача. Выявлена зависимость динамики накопления эфирного масла и доминантных компонентов от фазы вегетации растения.
5. Разработана модифицированная методика стандартизации сырья по флавоноидам, в пересчете на флавоноид 7-метил судохитин. В рамках стандартизации сырья по фенольным соединениям в экстрактах были определены флавоноид-апигенин и фенилпропаноидный гликозид – вербаскозид.
6. Экстракты сырья дикорастущей и культивированной зизифоры проявляют выраженную антиоксидантную активность. Показано, что наиболее высокую АОА проявляют экстракты из сырья, собранного из Бердадзора. Эфирные масла сырья зизифоры, дикорастущей и выращенной в условиях гидропоники, проявляют сравнительно выраженную антимикробную активность против *Staphylococcus aureus* MDC 5233, *Enterococcus faecalis* MDC 5254, *Bacillus subtilis* MDC 1820, *Streptococcus faecalis* MDC 5242, *Mycobacterium spp.* MDC 5237, *Bacillus coagulans* MDC 1906.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ulikhanyan G.R., Chichoyan N.B., Galstyan H.M., The study of raw reserves and the cultivation possibilities of wild growing species of the *Ziziphora clinopodioides* Lam, materials of VI International conference on Modern aspects of rehabilitation in medicine, Yerevan-2013, p. 363.
2. Ուլիխանյան Գ.Ռ., Չիչոյան Ն.Բ., Գալստյան Հ.Ս., *Ziziphora clinopodioides* Lam. բուսատեսակի կիրառման հեռանկարները, Հայաստանի բժշկագիտություն, ՀՀ ԳԱԱ, հ. LIII N4, Երևան, 2013, օր.155-161.
3. Улиханян Г.Р., Чичоян Н.Б., Галстян А.М., Погосян М.К., Улиханян Г.И., Изучение физико-химических параметров эфирных масел зизифоры пахучковидной (*Ziziphora clinopodioides* Lam.) флор Армении и Арцаха, ЕГМУ им. Гераци, Ежегодная отчетная научная конференция, Сборник научных статей, том I, Ереван, 2013, օր. 221-227.
4. Չիչոյան Ն.Բ., Դումանյան Կ.Հ., Գալստյան Հ.Ս., Ուլիխանյան Գ.Ռ., Ուլիխանյան Դ.Ի., Հայաստանում վայրի անող *Ziziphora clinopodioides* Lam. բուսատեսակի հումքային պաշարների ուսումնասիրումը և մշակման հնարավորությունները, Հայաստանի կենսաբ. հանդես, 1(66), Երևան, 2014, էջ.78-81.
5. Улиханян Г.Р., Фитохимическое изучение эфирных масел из *Ziziphora clinopodioides* Lam. дикорастущей во флоре Арцаха, Сборник научных статей, посвященный 50-летию НИЦ ЕГМУ, Ереван, 2014, օր. 157-161.
6. N.B. Chichoyan, G.R. Ulikhanyan, Galstyan A.M., Gh.I. Ulikhanyan, Phytochemical study on *Ziziphora Clinopodioides* Lam essential oils wild-growing in the Armenian flora and grown up in the conditions of a hydroponics, International Scientific Journal, Journal of Medical and Biological Sciences, materials of International conference on «Biochemistry and molecular biology», Vol. 2, Paris, France, 2015, pp.73-79.
7. Улиханян Г.Р., Думанян К.Г., Физико-химические методы, применяемые в анализе лекарственного растительного сырья и растительных препаратов, “Применение современных научных методов и технологий в области экспертиз”, Международная конференция Посвящена 10-летию со дня основания Национального бюро экспертиз НАН РА, Ереван - Цахкадзор, 2015, օր.384-387.
8. G.R. Ulikhanyan, Dynamics of the accumulation biologically active substances and component composition of the essential oils of *Ziziphora clinopodioides* Lam. Armenian flora, “Current Issues of Medical Science” Conference dedicated to the 95th anniversary of the Yerevan State Medical University after M. Heratsi, The new armenian medical journal, Yerevan, 2015, p.31.
9. Ulikhanyan G.R., Chichoyan N.B., Galstyan H.M., Martirosyan S.S., Ulikhanyan Gh.I., The study of the chemical composition of essential oil *Ziziphora clinopodioides* Lam. by Gas chromatography-mass spectrometry method of the Armenian flora, VI International scientific and practical conference, "Actual problems of science of the XXI century", III part, Moscow, Russia, 2016, pp. 142-149.
10. Улиханян Г.Р., Ананикян Г.С., Ананикян В.В., Чичоян Н.Б., Галстян А.М., Улиханян Г.И., Сравнительная антирадикальная активность экстрактов зизифоры пахучковидной (*Ziziphora clinopodioides* Lam.) дикорастущей и выращенной в условиях гидропоники, VIII Международная конференция “Современные аспекты реабилитации в медицине”, Ереван-Степанакерт, 2017, օր. 352.

11. Ulikhanyan G.R., Chichoyan N.B., Galstyan A.M., Ulikhanyan Gh.I., Development method of *Ziziphora clinopodioides* Lam. standardization by flavonoids, Health Education, Research, International Agency for Development of Culture, Education and Science, Issue 6 (2), (December), Volume 32, , Oxford University Press, 2017, pp. 1633 – 1640.
12. Ulikhanyan G.R., Galstyan H.M., Tsaturyan A.H., Chichoyan N.B., Standardization of the raw material *Ziziphora clinopodioides* Lam. by HPLC and spectrophotometric methods, Toxicon, «19th Congress of the European section of the international society of toxinology» materials of International congress (abstract), Volume 159, Supplement1, March 2019, Yerevan, Armenia, S30P 061.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.11.420>
13. Ulikhanyan Greta, Poghosyan Gayane, Shekoyan Vladimir, Ananikyan Violeta, Chichoyan Naira, Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil and extract of *Ziziphora clinopodioides* Lam., 5-th International medical congress of Armenia, Armenia - Diaspora - Artsakh, Yerevan, July 4-6, 2019, 305 (ID: 369).
14. Ulikhanyan G.R., Galstyan H.M, Chichoyan N.B., Determination of mineral composition of the raw material of *Ziziphora clinopodioides* (Lam.), Medicine, science and education, Scientific and informational journal, november - No.28, UDC: 615.32:549. Yerevan, 2019, p.112.
15. Ulikhanyan Greta, Tsaturyan Avetis, Dumanyan Karine, Altunyan Astghik, Beglaryan Margarita, Hovsepyan Maya, Chichoyan Naira, Standardization of *Ziziphora clinopodioides* Lam. cultivated and wild growing in the South-Caucasian flora, Farmacia, 2022, Vol. 70, 1, pp.158-163.
<https://doi.org/10.31925/farmacia.2022.1.23>
16. Greta R. Ulikhanyan, Karine H. Dumanyan, Naira B. Chichoyan, Determination of antioxidant activity of raw material of *Ziziphora clinopodioides* Lam. cultivated and wildy growing in the floras of Armenia and Artsakh, Bulletin of the medical institute after Mehrabyan, vol.12, Yerevan, 2022, pp.71-80.
17. Ուլիխանյան Գ.Ռ., Չիչոյան Ն.Բ., Գալստյան Հ.Ս., ԱՐՏՈՆԱԳԻՐ №3223A, Դեղաբույսում ֆլավոնոիդների գումարային պարունակության որոշման սպեկտրոֆոտոմետրիկ եղանակ, 03.09.2018:

Գ.Ռ. Ուլիխանյան

ՀԱՅԱՍՏԱՆԻ ԵՎ ԱՐՑԱՆԻ ՖԼՈՐԱՆԵՐՈՒՄ ՎԱՅՐԻ ԱՃՈՂ, ՀՈՂՈՒՄ ԵՎ ՀԻՂՐՈՊՈՆԻԿ ՊԱՅՄԱՆՆԵՐՈՒՄ ԱՃԵՑՎՈՂ ՈՒՐՑԱԳՎԳՂՁ ՎԱՅՐԻ ՌԵՀԱՆՏՈՒՐՑԱՆՄԱՆԻ (ZIZIPHORA CLINOPODIOIDES LAM.) ՀԵՏԱԶՈՏՈՒՄԸ ԵՎ ՖԱՐՄԱԿՈԳՆՈՍՏԻԿ ԳՆԱՀԱՏՈՒՄԸ

ԱՄՓՈՓՈՒՄ

Կենսաբանորեն ակտիվ նոր բուսահումքերի բացահայտման և դրանց հիման վրա արդյունավետ դեղապատրաստուկների մշակման տեսանկյունից միանգամայն հեռանկարային է Հայաստանի և Արցախի ֆլորաներում աճող ուրցադաղձ վայրի ռեհանաուրցանման (*Ziziphora clinopodioides* Lam.) բուսատեսակը: Բույսի ուսումնասիրության համալիր՝ հումքաբանական, ապրանքագիտական, ֆիտոքիմիական և ֆիզիկաքիմիական հետազոտությունները բացակայում են և չկան հումքը չափորոշող փաստաթղթեր: Վերջինս հիմք հանդիսացավ Հայաստանում և Արցախում վայրի աճող ուրցադաղձերի աճման վայրերի և պոպուլյացիաների բացահայտման, բուսատեսակի հերբարիզացման, հումքային բազայի ստեղծման նպատակով՝ աճեցման հնարավորությունների դիտարկման, ինչպես նաև, ֆարմակոգնոստիկ և կենսաբանական ակտիվության ուսումնասիրության համար:

Կատարվել է Հայաստանի և Արցախի տարբեր շրջաններից հավաքված ուրցադաղձ վայրի ռեհանաուրցանման բուսատեսակի նույնականացումը և հերբարիզացումը (հերբարիումները պահվում են ՀՀ ԳԱԱ Ա.Թախտաջյանի անվան բուսաբանության ինստիտուտի պահուցում՝ համապատասխանաբար ERE N194583 և ERE N201407 համարներով): Հումքաբանական վերլուծության համաձայն՝ Հայաստանի և Արցախի ֆլորաներում հայտնաբերվել են բույսի պոպուլյացիաները, որոնցում հումքի պաշարի խտությունը կազմել է 3 ± 0.2 (թուփ/մ²): Բացահայտվել են վայրի աճող, ինչպես նաև հողում և հիդրոպոնիկ պայմաններում աճեցված տեսակներից հավաքված հումքերի ձևաբանաանատոմիական հատկանիշները (եթերայուղային բնորոշ գեղձիկներ, գեղձային մազիկներ, գլխիկավոր մազիկներ, օղակաձև անոթներ, անոմոցիտ հերձանցքներ) և ապրանքագիտական ցուցանիշները (խոնավություն՝ 9.25%-ից ոչ ավելի, ընդհանուր մոխիր՝ 10.96%-ից ոչ ավելի, լուծամզվող նյութերի հանրագումար՝ 12.09%-ից ոչ պակաս, եթերայուղի էլք վայրի աճող բույսերից մթերված հումքերի դեպքում՝ 0.79%-ից ոչ պակաս, աճեցվող բույսերի դեպքում՝ 0.14%-ից ոչ պակաս): Հիմնավորվել է տեխնոլոգիական մի շարք գործոնների (մանրեցվածություն, էքստրազենտ) ազդեցությունը լուծամզման գործընթացի վրա: Հաստատվել են հետազոտվող հումքերից ստացված եթերայուղերի ֆիզիկական ցուցանիշները (բեկման ցուցիչ, հարաբերական խտություն) և դիտարկվել դրանց փոփոխությունը բույսի վեգետացիայի տարբեր փուլերում (մինչձաղկում, ձաղկում): Ցույց է տրվել, որ հումքի՝ ժամանակին մթերելու դեպքում, եթերայուղերի բեկման ցուցիչները գտնվում են 1.474–1.489 միջակայքում: Հետազոտության արդյունքների համաձայն՝ որոշվել և վիճակագրորեն վերլուծվել են Հայաստանի և Արցախի ֆլորաներում վայրի աճող, հողում և հիդրոպոնիկ պայմաններում աճեցվող տեսակներից հավաքված հումքերի հանքային բաղադրությունները, ինչպես նաև ըստ միջազգային չափորոշիչների գնահատվել է ուսումնասիրվող բոլոր հումքերի էկոլոգիական անվտանգությունը: Ցույց է տրվել, որ բուսահումքը ոչ միայն կենսական կարևոր

հանքային տարրերի աղբյուր է, այլ նաև՝ գեոքիմիական արժեքավոր ինդիկատոր: Հետազոտվող բոլոր նմուշների դեպքում իրականացվել է քեմոմետրիկ վերլուծություն, որի համաձայն բացահայտվել են ըստ հանքային բաղադրության առանձնացված նույնական խմբերի և բույսի կողմից էթերայուղ, ինչպես նաև կենսաակտիվ նյութեր (պուլեգոն, ապիգենին, վերբասկոզոլ) կուտակելու ունակության միջև գործող հնարավոր կոռելյացիոն կապերը ծովի մակարդակից բարձրության և աճեցման պայմաններից կախված: Գազային քրոմատագրման արդյունքում՝ հետազոտվող հումքերի էթերայուղերում նույնականացվել է 60 և ավելի բաղադրանյութ, որոնցում գերակշռել են մոնոտերպենները և դրանց թթվածնային ածանցյալները (պուլեգոն, վերբենոն, էվկալիպտոլ, լիմոնեն, DL(±) մենթոլ): Հայտնաբերված 22 դոմինանտ բաղադրանյութերի համար որոշվել են միջազգայնորեն հաստատված Կովաչի ցուցանիշները: Հետազոտության ընթացքում բացահայտվել են բույսի՝ էթերայուղ կուտակելու ունակության և գերակշռող բաղադրանյութերի միջև առկա կապերը վեգետացիայի տարբեր փուլերում: Նախնական ստանդարտավորման շրջանակներում՝ երկրորդային մետաբոլիտների դերը գնահատելու տեսանկյունից, բուսահումքերի սպիրտային լուծամզվածքներում հաստատվել է ապիգենին ֆլավանոիդի և վերբասկոզոլ ֆենիլպրոպանոիդային գլիկոզիդի որակաքանակական կազմը և տրվել դրա համեմատական վերլուծությունը ըստ բնակլիմայական պայմանների և աճեցման եղանակների: Ստացված տվյալների համաձայն՝ ցույց է տրվել, որ աճման բնակլիմայական պայմանները և աճեցման եղանակներն էականորեն ազդում են կենսաակտիվ նյութերի՝ տվյալ դեպքում, ֆենոլային միացությունների կուտակման դինամիկայի վրա: Բուսահումքերում որոշվել է նաև ֆլավանոիդների հանրագումարը՝ ըստ 7-մեթիլխտոդահիտինի և մշակվել է մոդիֆիկացված մեթոդ, որն արտոնագրվել է:

Բուսահումքերի կենսաբանական ակտիվությունը դիտարկելու տեսանկյունից ուշագրավ էր վայրի աճող և հիդրոպոնիկ եղանակով աճեցվող ուրցադաղձերից անջատված սպիրտային չոր լուծամզվածքների հակաօքսիդանտային ակտիվության ուսումնասիրումը: Լուծամզվածքների համար հաստատվել են IC₅₀ արժեքները:

Մանրէաբանական հետազոտության արդյունքների համաձայն՝ բացահայտվել է վայրի աճող և հիդրոպոնիկ եղանակով աճեցվող ուրցադաղձերից անջատված էթերայուղերի հակամանրէային ակտիվությունը *Staphylococcus aureus* MDC 5233, *Enterococcus faecalis* MDC 5254, *Bacillus subtilis* MDC 1820, *Streptococcus faecalis* MDC 5242, *Mycobacterium spp.* MDC 5237, *Bacillus coagulans* MDC 1906 շտամերի նկատմամբ: Առավելապես արտահայտված հակամանրէային ակտիվություն է դիտվել *Staphylococcus aureus* MDC 5233, *Streptococcus faecalis* MDC 5242 և *Mycobacterium spp.* MDC 5237 մանրէների նկատմամբ:

Այսպիսով, դասական և ժամանակակից ֆիզիկաքիմիական մեթոդների կիրառմամբ Հայաստանի և Արցախի ֆլորաների վայրի աճող, ինչպես նաև հողում և անհող պայմաններում աճեցված ուրցադաղձ վայրի ռեհանաուրցանմանի տեսակներից հավաքված հումքերի համալիր ֆարմակոգնոստիկ հետազոտությունը նախադրյալներ կարող է ստեղծել ոչ միայն բժշկական նպատակներով բուսահումքի կիրառման, այլև գիտազործական արժեքներկայացնել շրթնածաղկագզիների ընտանիքի դեռևս չուսումնասիրված բույսերի ստանդարտավորման և չափորոշող փաստաթղթերի մշակման գործընթացի համար:

Greta R. Ulikhanyan

THE STUDY AND PHARMACOGNOSTIC ASSESSMENT OF THE ZIZIPHORA CLINOPODIOIDES LAM. WILD GROWING IN THE FLORA OF ARMENIA AND ARTSAKH, AND CULTIVATED IN SOIL AND HYDROPONIC CONDITIONS

Summary

Ziziphora (*Ziziphora clinopodioides* Lam.), growing in the Armenian and Artsakh flora is promising in terms of discovering new biologically active plant raw materials and developing effective herbal medicines based on them. Resourcesological, commodity, phytochemical and physicochemical investigations as well as normative technical documents for the raw materials are lacking for the complex study of the plant. They served as a background for identifying the places of growth and populations of wild *Ziziphora* in Armenia and Artsakh, for herbarization of plant species, exploring their potential for cultivation, as well as for studying the pharmacognostic and biological activity. The identification and herbarization of *Ziziphora* wild plant collected from different regions of Armenia and Artsakh was performed as part of the thesis work, (the herbarium is kept in the repository of the A. Takhtajyan Institute of Botany of the NAS, RA, respectively under the numbers ERE N194583 and ERE N201407). According to the resourcesological analysis, plant populations were found in the flora of Armenia and Artsakh, where the density of raw material was 3 ± 0.2 (shrub/m²).

Morpho-anatomical features of wild-growing raw materials, as well as species cultivated in soil and hydroponic conditions were revealed (typical essential oil glands, glandular capitate trichomes, annular vessels, anomocyste stomata) and quality indices (loss on drying not more than 9.25%, total ash not more than 10.96%, extractive substances not less than 12.09%, yield of essential oil not less than 0.79% for raw materials obtained from wild plants, less than 0.14% for cultivated plants).

The influence of various technological factors (particle size distribution, extragent) on the extraction process is substantiated.

Physical indices (refractive index, relative density) of the essential oils obtained from the tested raw materials were confirmed, and their value variations were observed at different stages of vegetation (pre -blossoming, blossoming) of the plant.

Raw materials harvested at the appropriate time proved to have an essential oil refractive index in the range of 1.474 – 1.489.

Due to study results was determined and statistically analyzed the mineral compositions of raw materials obtained from various wild-growing species cultivated either in soil or hydroponic conditions within the flora of Armenia and Artsakh. Moreover, the ecological purity of all the raw materials under investigation was evaluated in accordance with international standards.

It was shown that the plant material was not only a source of vital mineral elements, but also a valuable geochemical indicator.

Chemometric analyses were performed for all tested samples, revealing potential correlations between identical groups separated by mineral composition and the plant's

capacity to accumulate essential oil and bioactive substances, (pulegone, verbascoside, and apigenin) depending on altitude above sea level and growing conditions.

As a result of gas chromatography, over 60 chemical compounds were detected in the essential oils of the examined raw materials. Among these, the dominant compounds were monoterpenes and their oxygenated derivatives (such as pulegone, verbenone, eucalyptol, limonene, and DL(\pm) menthol).

Internationally confirmed Kovats indices were determined for the identified 22 dominant composites. This study revealed the relationship between the plant's ability to accumulate essential oils and its major constituents at different stages of vegetation.

Within the framework of preliminary standardization, from the point of view of assessing the role of secondary metabolites, the qualitative composition of the flavanoid apigenin and the phenylpropanoid glycoside verbascoside in alcoholic extracts of plant raw materials was established and was given its comparative analysis depending on climatic conditions and cultivation methods. According to the obtained data, it was shown that growing conditions and cultivation methods significantly affect the dynamics of accumulation of bioactive substances, particularly on the accumulation of phenolic compounds. The total sum of flavonoids in the plant raw materials due to 7-methylsudahitin was also determined and a modified method was developed which was patented.

From the point of view of observing the biological activity of the investigated plant raw materials, it was very noteworthy to study the antioxidant activity of dry alcoholic extracts isolated from *Ziziphora* growing wildly and hydroponic conditions. The research results indicated that the solutions possessed pronounced antioxidant activity. Also, IC₅₀ (inhibitory concentrations) for solutions were determined.

Through microbiological investigation the antibacterial activity of essential oils isolated from wild *Ziziphora* and cultivated on hydroponic conditions against *Staphylococcus aureus* MDC 5233, *Enterococcus faecalis* MDC 5254, *Bacillus subtilis* MDC 1820, *Streptococcus faecalis* MDC 5242, *Mycobacterium* spp. MDC 5237, *Bacillus coagulans* MDC 1906 strains was discovered. The most pronounced antimicrobial activity was observed against *Staphylococcus aureus* MDC 5233, *Streptococcus faecalis* MDC 5242 and *Mycobacterium* spp. MDC 5237 for bacteria.

Thus, using classical contemporary and physico-chemical methods, a comprehensive pharmacognostic study of *Ziziphora* raw materials collected from the Armenian and Artsakh flora, as well as from species growing in soil and hydroponic conditions, can create prerequisites not only for the use of the plant raw materials for medical purposes but also represent serious scientific and practical value to those not yet studied plants of the *Labiateae* family in the process of developing standards and normative technical documents.