

УДК 615.1+615.32[543.421/.424+543.544.5.0.68.7+54.412.2]

## ИЗУЧЕНИЕ ЛИСТЬЕВ *RHODODENDRON LUTEUM SWEET* КАК ИСТОЧНИКА ПОЛУЧЕНИЯ ГРАЙАНОТОКСИНА III

© А.Н. Тишина\*, С.В. Печинский, А.Г. Курегян

Пятигорский медико-фармацевтический институт – филиал ФГБОУ ВО  
ВолеГМУ, пр. Калинина 11, Пятигорск, 357532, Россия,  
al.tishinatishina@yandex.ru

Грайановые дитерпеноиды – группа вторичных метаболитов семейства *Ericaceae*, заслуживающая отдельного внимания, так как их биосинтез, в частности, у рододендронов, имеет хемотаксономическое единство и видовую специфичность. Листья рододендрона желтого (*Rhododendron luteum Sweet*), произрастающего на территории РФ, как источник получения индивидуальных грайанотоксинов (GTX III) ранее не рассматривались. Цель исследования – изучить листья рододендрона желтого как источник получения GTX III. В работе использованы методы жидкостной экстракции, ИК-спектроскопии, УФ-спектроскопии, колоночной хроматографии, ВЭЖХ. По результатам эксперимента выбраны условия получения GTX III из листьев рододендрона желтого – это сочетание метода жидкостной экстракции (экстрагент – спирт этиловый 95%; гидромодуль – 1 : 10; число ступеней экстракции – 2; время экстракции на каждой ступени – 2 ч с обратным холодильником; температура экстракции –  $78 \pm 2$  °С) и колоночной хроматографии (неподвижная фаза – силикагель-60 для хроматографии; подвижная фаза для элюирования «хлороформ – метанол 9 : 1»; объем каждой фракции – 10 мл). Осаждение целевого соединения проводили из фракции 14 при температуре  $-20$  °С в течение 24 ч. В описанных условиях получено одно соединение грайанового типа с температурой плавления  $219$  °С, имеющее время удерживания около 48 мин в условиях ВЭЖХ-анализа. По результатам анализа методом ИК-спектроскопии установлено, что полученное соединение является GTX III.

*Ключевые слова:* рододендрон желтый, грайанотоксин III, листья рододендрона желтого, жидкостная экстракция, колоночная хроматография, температура плавления, ИК-спектроскопия, ВЭЖХ.

---

**Для цитирования:** Тишина А.Н., Печинский С.В., Курегян А.Г. Изучение листьев *Rhododendron luteum Sweet* как источника получения грайанотоксина III // Химия растительного сырья. 2024. №2. С. 226–236. DOI: 10.14258/jcprm.20240212899.

---

### Введение

Растения рода *Rhododendron* характеризуются широким спектром фармакологической активности, который связывают с их вторичными метаболитами. Например, с простыми фенольными соединениями и их гликозидами, к которым относят арбутин. Так, в рододендроне желтом, по данным литературы, содержание арбутина колеблется от 0.9 до 2% [1]. Наиболее изученной группой вторичных метаболитов представителей рода рододендрон являются флавоноиды [2–5]. Для рододендрона желтого (*Rhododendron luteum Sweet*) известно наличие двенадцати флавоноидов [6], пять из которых – кверцетин, азалеатин, гиперозид, гваяверин и мирицетин – выделены в виде индивидуальных соединений [7]. Содержание флавоноидов в рододендроне желтом достигает 8% [7]. Из 98 видов рододендронов получено 69 производных фенолкарбоновых и гидроксикоричных кислот [6, 8–11]. Кроме того, из растений этого вида были выделены и другие вторичные метаболиты, а именно кумарины [9], хромоны [12], терпеновые производные [6, 13, 14].

Однако наиболее многочисленной и распространенной группой вторичных метаболитов растений семейства Вересковые (*Ericaceae*), насчитывающей порядка 290 соединений, являются дитерпеноиды грайанового типа. Они признаны специфичными вторичными метаболитами *Ericaceae*, их биосинтез характерен для родов *Pieris*, *Kalmia*, *Craibiodendron*, *Leucothoe* и *Rhododendron* [15]. Дитерпеноиды грайанового типа как специфическая группа вторичных метаболитов семейства *Ericaceae*, на наш взгляд, заслуживает отдельного внимания, так как именно их связывают с антиноцицептивным, антигипертензивным и цитотоксическим действиями рододендронов [12, 16, 17].

---

\* Автор, с которым следует вести переписку.

Грайанотоксины (GTX) – дитерпеноиды с уникальными конденсированными тетрациклическими системами – C5/C7/C6/C5 [11, 16, 18–20]. Максимальное число GTX в виде индивидуальных соединений выделено из растений рода *Rhododendron* [15]. GTX содержатся во всех частях растений, но, по данным литературы, их максимальное количество накапливается в цветках листопадных рододендронов. Кроме того, GTX содержатся в меде, полученном из цветков рододендрона желтого и рододендрона понтийского (*Rhododendron ponticum* L.), основными дитерпеноидами которого являются грайанотоксин I (GTX I) и грайанотоксин III (GTX III) [15, 18, 21–23]. В литературе имеются данные, свидетельствующие об отравлениях отварами листьев и цветков рододендронов, а также «бешеным» медом. Эти отравления имеют общую клиническую картину: слабость, головокружение, слюнотечение, понижение артериального давления и брадикардия [15, 22, 24–26]. Несмотря на это, рододендроны активно используются в народной и традиционной медицине как болеутоляющее, антигипертензивное и противовоспалительное средство, а мед, содержащий GTX, применяют для регулирования уровня глюкозы и нормализации кровотока [15, 22]. Еще в 1971 г. Н.В. Беловой отмечено, что андромедотоксин (GTX I, ацетиландромедол) – это мощное гипотензивное средство типа вератрина и аконитина [17]. Вместе с этим экспериментально подтверждены антиноцицептивные эффекты GTX I, GTX III и GTX IV [24, 25, 27], установлено, что GTX I и GTX III эффективны в дозах 0.2 мг/кг, а GTX IV – 0.04 мг/кг [24, 27]. Кроме того, показано, что GTX эффективны при нейропатической боли при сахарном диабете [15, 22], а GTX I оказывает положительный инотропный эффект на изолированные предсердия морских свинок [20, 27].

Основным способом получения GTX является извлечение их из растительных объектов, поскольку в ходе химического синтеза образуется значительное число побочных продуктов, которые затрудняют очистку целевого соединения. В 1971 г. Н.В. Беловой из отходов эфирномасличного производства – цветочной массы рододендрона желтого был выделен GTX I (андромедотоксин, ацетиландромедол), автором сделал вывод о перспективности этого сырья для промышленного получения GTX I в нашей стране [17]. Необходимо отметить, что листья рододендрона желтого, произрастающего на территории РФ, как источник получения индивидуальных GTX ранее не рассматривались. Мы посчитали получение индивидуальных соединений GTX перспективным направлением, поскольку они проявляют антиноцицептивную, антигипертензивную и цитотоксическую активность, в дальнейшем могут служить моделями для изучения взаимосвязи структура/активность GTX и оптимизации молекулы с целью снижения их токсичности при сохранении фармакологической активности.

Цель исследования – изучить листья рододендрона желтого (*Rhododendron luteum* Sweet.) как источник получения GTX III.

### **Экспериментальная часть**

В качестве *исходного сырья* использовали листья рододендрона желтого (*Rhododendron luteum* Sweet), собранные у подножия Джинальского хребта в окрестностях г. Кисловодска. В эксперименте использовали сырье, заготовленное в июне-июле 2021 и 2022 гг. и высушенное воздушно-теньевым способом до остаточной влажности не более 10.5%.

**Методика получения экстракта.** Около 5.0 г (точная навеска) сырья измельчали до размера частиц, проходящих через сито с отверстиями 1 мм, помещали в колбу со шлифом вместимостью 250 мл, прибавляли 50 мл экстрагента (или воды, или спирта этилового 70%, или спирта этилового 95%). Колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане до 100 °C (вода) или до 78±2 °C (спирт этиловый 70% или спирт этиловый 95%) в течение 120 мин, периодически встряхивая. Горячее извлечение фильтровали в склянку из темного стекла через бумажный фильтр (синяя лента). Экстрагирование повторяли еще раз в описанных выше условиях. Полученные извлечения объединяли [28].

**Получение GTX III.** В колонку, заполненную 10 г силикагеля-60 для хроматографии, вводили по 0.4 мл экстракта, последовательно элюировали подвижной фазой «хлороформ – метанол (9 : 1)», объем каждой фракции – 10 мл, для каждой фракции регистрировали спектры поглощения в интервале длин волн от 190 до 700 нм, фракция 14 содержала GTX III. Процедуру повторяли необходимое количество раз до наработки нужного количества целевого соединения. Фракции 14 нескольких последовательных циклов объединяли, помещали в морозильную камеру при температуре -20 °C на 24 ч. Надосадочную жидкость сливали, остаток

растворителя удаляли в вакуумном испарителе. Кристаллы GTX III объединяли, сушили в эксикаторе над концентрированной кислотой серной, переносили в ампулы и запаивали.

*Условия ВЭЖХ-анализа.* Определение проводили в изократическом режиме с УФ-детектором при длине волны 210 нм; колонка – 25×0.46 см, 5 мкм, Luna C18 Phenomenex; подвижная фаза: ацетонитрил – 0.05 М фосфорная кислота (2 : 8); скорость потока – 1 мл/мин, объем вводимой пробы – 20 мкл [28].

Регистрацию ИК-спектров и УФ-спектров проводили в соответствии с требованиями методик, приведенных в ГФ XIV [29].

Определение *температуры плавления* проводили методом 1 на приборе для определения температуры плавления ПТП (М) в соответствии с требованиями ГФ XIV [29], результат приведен для трех параллельных определений.

### **Обсуждение результатов**

Учитывая данные литературы о том, что листопадные виды рододендронов являются более ядовитыми, а это их свойство связывают именно с накоплением GTX, мы посчитали целесообразным, в первую очередь, изучить GTX рододендрона желтого как единственного листопадного вида среди «кавказских» рододендронов, произрастающих на территории РФ. Считается, что больший процент GTX накапливается в цветках «кавказских» видов. Однако в перспективе, при необходимости создания и развития достаточной сырьевой базы, на наш взгляд, оптимальным было бы использовать именно листья листопадных рододендронов, так как они интродуцируются лучше, чем вечнозеленые – это их преимущество с экономической и ресурсоэкономической позиций [30].

Предварительно перед проведением эксперимента, основываясь на данных литературы, теоретически были выбраны основные экстрагенты для экстракции GTX из растительного сырья. Для экстракции GTX, как правило, используют *n*-бутанол [31], этилацетат [32, 33], ацетон [34], метилхлорид [31–33], спирт этиловый с концентрацией 70% [35] и выше [18, 19, 27]. С учетом «зеленого подхода» к выбору растворителей, их токсичности, взрывоопасности и требований по нормированию остаточных органических растворителей [29] мы отказались от использования в эксперименте *n*-бутанола, этилацетата, ацетона и метилхлорида. В качестве базовых органических экстрагентов были выбраны растворы спирта этилового 70 и 95% [28].

Отдельного внимания заслуживает «зеленый» экстрагент – вода. По данным литературы, именно водные отвары рододендрона желтого могут вызывать отравления, но эти последствия наблюдаются только при чрезмерном и бесконтрольном употреблении отваров. Водные отвары, как правило, получают не из одного вида сырья, например, только цветков или только листьев, а используют в качестве сырья и листья, и цветки, и побеги [36], за счет этого, вероятнее всего, имеет место высокое концентрирование GTX, а следовательно, и токсический эффект отвара. Выбор в пользу применения одного сырья, например, только листьев, для получения GTX был сделан потому, что несколько видов сырья – это всегда большее число классов биологически активных соединений (БАС) в суммарном экстракте, что с точки зрения получения индивидуальных соединений затруднит их дальнейшую очистку. Очевидно, что на экстракцию GTX будут влиять как технология получения экстракта, так и исходное сырье, поэтому выбрав спирт этиловый в качестве экстрагента, мы не исключили возможность получить водный экстракт из листьев рододендрона желтого.

Для соблюдения системности в проведении эксперимента следовало получить три модельных экстракта из листьев рододендрона желтого с использованием воды, спирта этилового 70% и спирта этилового 95% по одинаковой технологической методике. В литературе встречаются следующие основные условия получения экстрактов из рододендронов: соотношение сырья и экстрагента – 1 : 5, 1 : 10 [18, 34, 35]; число ступеней экстракции – 1, 2 [32, 33]; температура – 20–25 °С (комнатная) [19, 31, 34], 35–25 °С и нагревание с обратным холодильником при температуре кипения экстрагента [32, 33]; время экстракции на каждой ступени от 1 ч до 14 суток в зависимости от температуры процесса [33]. Принимая во внимание данные литературы, результаты собственного предварительного эксперимента [28], условия получения экстрактов из листьев рододендрона желтого были выбраны нами экспериментально (табл.).

Разработка технологии получения соединений из природного сырья всегда должна учитывать возможность ее дальнейшего промышленного трансфера, поэтому далее все параметры экстракции рассматривались в контексте предварительной минимизации материальных затрат.

Результата выбора условий получения экстрактов из листьев рододендрона желтого

Условия экстракции	Вода	Спирт этиловый 70%	Спирт этиловый 95%
Гидромодуль			
1 : 5	–*	–	–
1 : 10	+**	+	+
Число ступеней экстракции			
1 ступень	–	–	–
2 ступени	+	+	+
Время экстракции на каждой ступени			
60 мин	–	–	–
120 мин	+	+	+
Температура экстракции			
100 °С	+	–	–
80 °С	–	+	+

Примечание: \* – неудовлетворительный результат эксперимента; \*\* – удовлетворительный результат эксперимента.

На первом этапе исследования был апробирован гидромодуль 1 : 5, однако его было недостаточно для полного смачивания сырья, в то время как гидромодуль – 1 : 10 позволил получить жидкие экстракты со всеми тремя растворителями. Увеличение значения гидромодуля до 1 : 20, с одной стороны, положительно скажется на экстракции в лабораторных условиях, так как приведет к повышению градиента для извлекаемых соединений, но, с другой стороны, при масштабировании методики такой гидромодуль – это всегда дополнительный расход растворителя, что невыгодно экономически. Другим аргументом в пользу значения гидромодуля 1 : 10 послужило то, что в таком объеме экстракта концентрация целевых соединений априорно выше и не требуется дополнительного концентрирования, например, сгущения экстракта.

Литературные данные отражают результаты эксперимента, в которых экстракция GTX проводилась при комнатной температуре, но при этом процесс занимал от 24 ч до 14 сут. [34]. Известно, что повышение температуры экстракции ведет к ее интенсификации, а получение отваров рододендрона подтверждает, что температура выше комнатной не приводит к разрушению GTX и позволяет извлекать их за более короткий промежуток времени [32]. Следует учитывать, что в условиях производства экстракция, например, в течение суток или 14 дней, приведет к вынужденному «простоя» производственных мощностей, например, экстракторов, что, вероятнее всего, будет снижать рентабельность процесса. Кроме того, при комнатной температуре экстракция ведется при постоянном перемешивании, а это всегда дополнительные энергозатраты. В связи с этим мы пока отказались от экстракции при комнатной температуре.

Вместе с тем в литературе опубликованы результаты получения экстрактов рододендронов при нагревании с числом ступеней экстракции 1 или 2, поэтому экспериментально апробировали оба этих варианта экстрагирования. Очевидно, что одновременно с выбором числа ступеней экстракции следовало оптимизировать температуру процесса и время экстракции на каждой ступени. Температуру экстракции определила температура кипения экстрагента: для воды – 100 °С, для спирта 70 и 95% – 78±2 °С. В ходе эксперимента постоянный и равномерный нагрев поддерживали с помощью лабораторного нагревателя, выкипание экстрагента предотвращали, используя обратный холодильник. Далее определяли число ступеней экстракции и время экстракции на каждой ступени, контроль над эффективностью экстракции осуществляли спектрофотометрически. Эксперимент показал, что экстракты, полученные при однократном кипячении в течение 60 мин, имели более низкое суммарное количественное содержание БАС, чем экстракты, полученные двухстадийной экстракцией с временем экстракции на каждой из ступеней 120 мин (рис. 1).

Таким образом, в выбранных оптимальных условиях получены три модельных экстракта из листьев рододендрона желтого. Характер профилей УФ-спектров показал, что концентрация БАС в них различная, но при этом имеется общий максимум поглощения в области около 200 нм, для экстракта, полученного 95% спиртом, он был наиболее интенсивным. Очевидно, что спектрофотометрический контроль не является специфичным, что обусловлено возможностями самого метода анализа, поэтому дальнейший анализ трех полученных экстрактов провели методом ВЭЖХ (рис. 2).

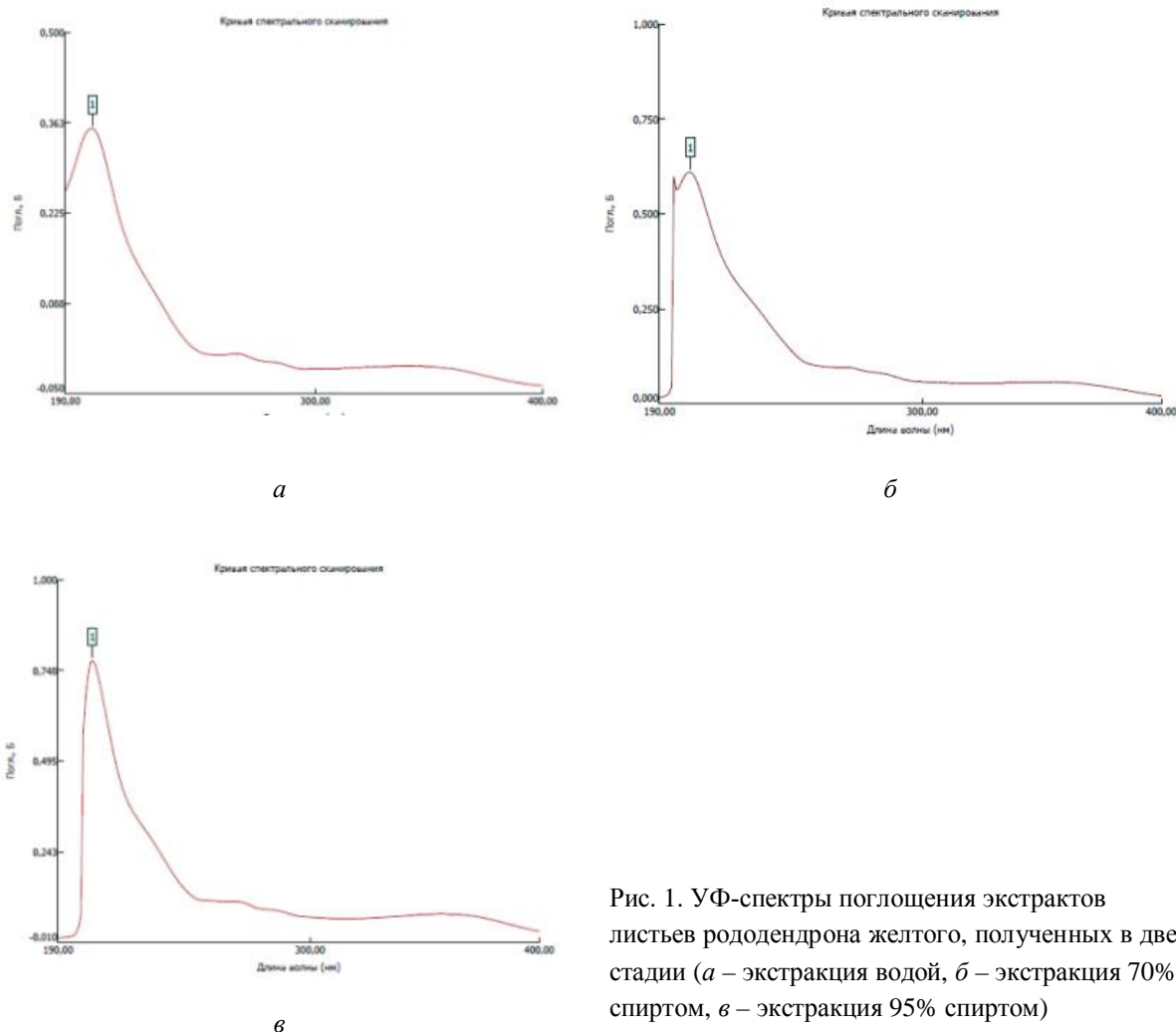


Рис. 1. УФ-спектры поглощения экстрактов листьев рододендрона желтого, полученных в две стадии (*а* – экстракция водой, *б* – экстракция 70% спиртом, *в* – экстракция 95% спиртом)

С учетом литературных данных по анализу грайановых дитерпеноидов и их физико-химических свойств в предлагаемых нами условиях GTX должны были иметь ожидаемые времена удерживания от около 42 до 65 мин [19, 27, 32, 34]. Эксперимент показал, что экстракты, полученные с использованием воды и 70% спирта этилового (рис. 2а), не содержали соединений с такими временами выхода пиков либо имели минимальные пики на уровне шума (рис. 2б) и экстрагировали более полярные группы БАС, предположительно флавоноиды и фенолокислоты. На хроматограмме экстракта, полученного 95% спиртом этиловым, был обнаружен пик с временем удерживания около 48 мин (рис. 2в). Предварительно соединение было отнесено в БАС грайанового типа. Далее в эксперименте использовали только экстракт, полученный 95% спиртом этиловым.

Для выделения соединения или соединений со временем удерживания около 48 мин следовало провести разделение компонентов экстракта, используя метод колоночной хроматографии. Этот прием исчерпывающе описан в литературе [19, 27, 31–35], поэтому была возможность теоретически выбрать состав подвижной фазы для разделения компонентов экстрактов методом колоночной хроматографии – «хлороформ-метанол» в соотношении 9 : 1. В процессе хроматографирования отбирали фракции равного объема 10 мл. Поскольку грайанотоксины имеют максимумы поглощения в интервале от 190 до 220 нм, состав фракций предварительно контролировали спектрофотометрически (рис. 3).

Присутствие максимума поглощения при  $203 \pm 2$  нм в спектре фракции 14 говорит о возможном наличии в ней грайанотоксинов. В связи с этим вещество фракции 14 перекристаллизовывали и далее подвергали анализу методом ВЭЖХ (рис. 4).

На хроматограмме полученного раствора установили наличие одного пика вещества со временем удерживания 47.94 мин, предположительно принадлежавший грайанотоксину.

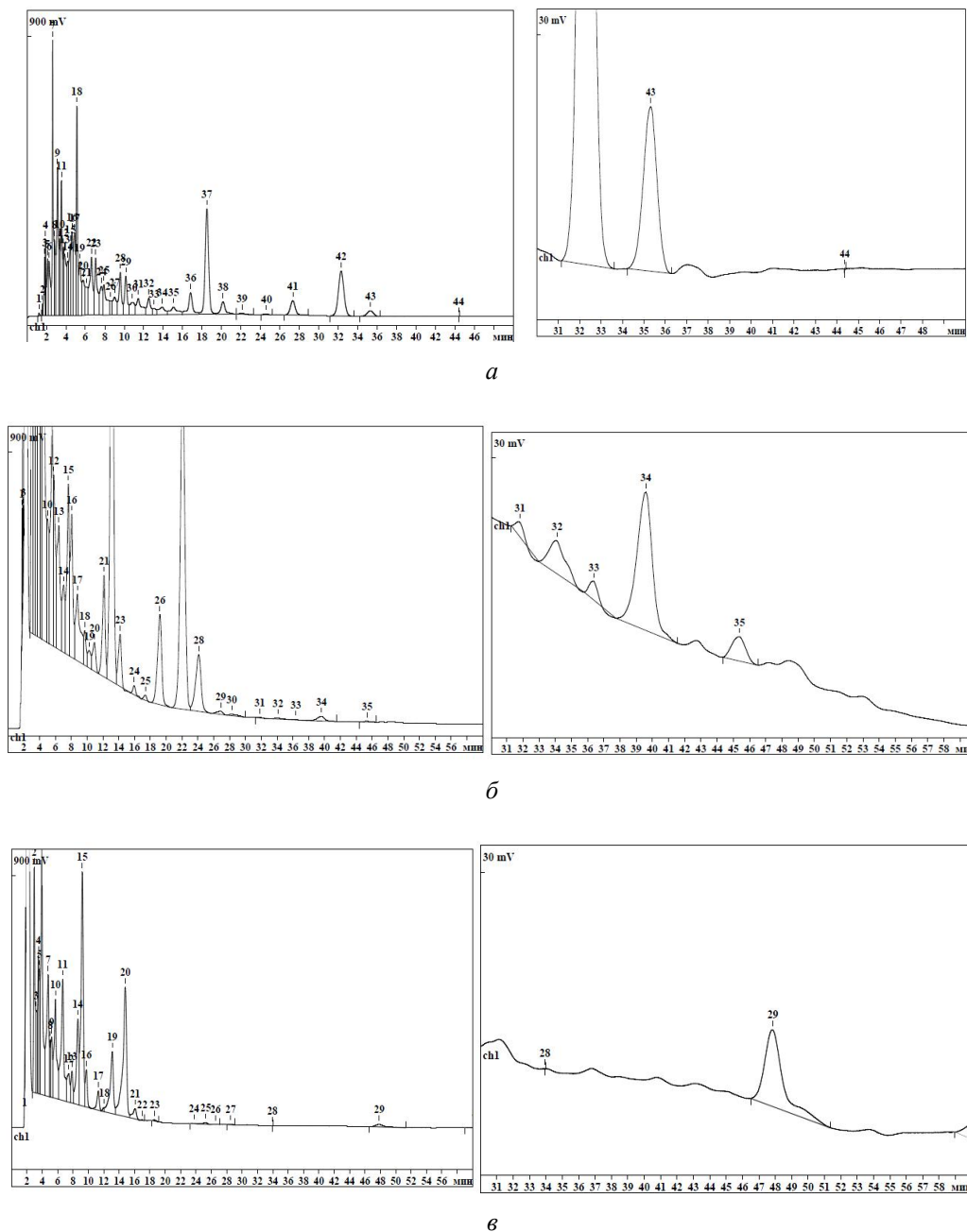


Рис. 2. ВЭЖХ-хроматограммы экстрактов листьев рододендрона желтого (а – экстракция водой, б – экстракция 70% спиртом, в – экстракция 95% спиртом)

Для соединения, выделенного из фракции 14, была определена температура плавления, которая составила 219 °С. Согласно данным литературы СТХ имеют следующие температуры плавления: СТХ I 256–259 °С [17, 37, 38], 240–241 °С [3], СТХ II 199–200 °С [39], СТХ III 218–222 °С [39], 266–268 °С [38], СТХ IV 167–168 °С [40]. Учитывая экспериментальный результат и литературные данные, полученное вещество предварительно было идентифицировано как СТХ III.

Для установления структуры полученного грайанотоксина регистрировали его ИК-спектр в дисках с калия бромидом (рис. 5).

На ИК-спектре выделенного соединения зафиксировали следующие полосы поглощения: 3435 (-ОН свободные; валентные); 2955; 2917; 2849 (-CH<sub>2</sub>-; -CH<sub>3</sub>-; валентные); 1425; 1246 (третичная -ОН; вторичная -ОН; валентные); 1124; 1076; (третичная -ОН; вторичная -ОН; деформационные); 1034, 865, 710 см<sup>-1</sup> (C-C; валентные в карбоциклах) [41, 42]. Полученные нами экспериментальные результаты коррелируют с литературными данными для GTX III [38, 39], в связи с чем грайанотоксин, полученный из фракции 14 экстракта листьев рододендрона желтого, идентифицировали как GTX III.

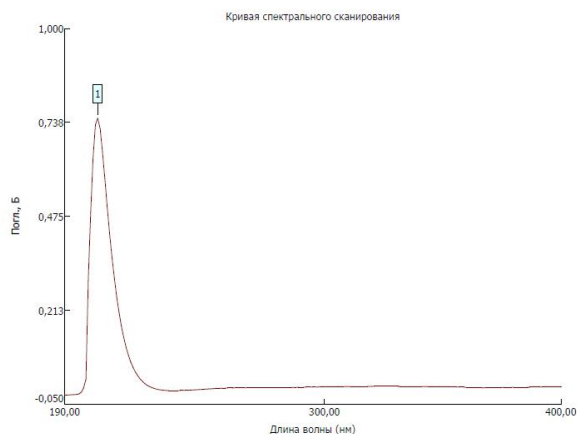


Рис. 3. УФ-спектр поглощения фракции 14

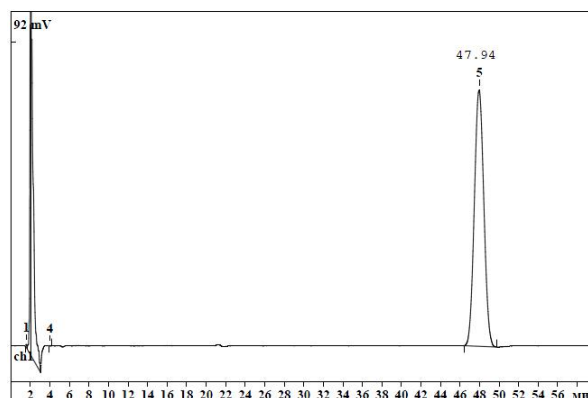


Рис. 4. Хроматограмма грайанотоксина, выделенного из фракции 14

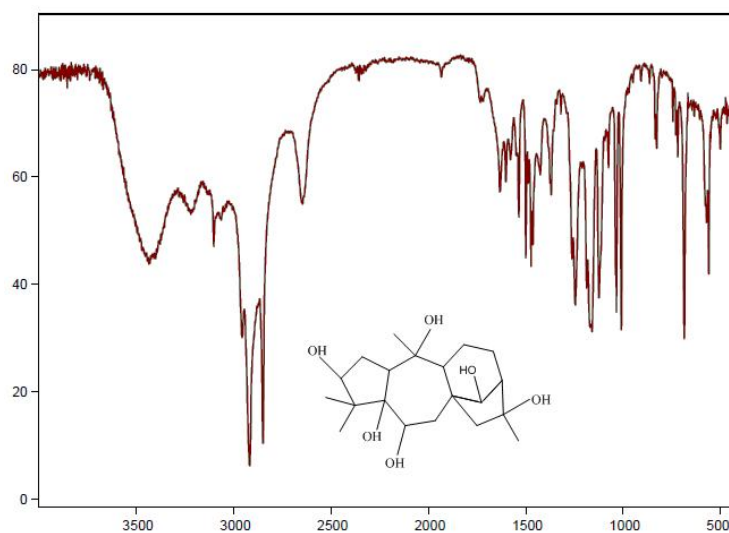


Рис. 5. ИК-спектр грайанотоксина, выделенного из фракции 14 (диски с калия бромидом)

### Выводы

1. Впервые из листьев рододендрона желтого, произрастающего на территории РФ, выделен GTX III. Установлена температура плавления выделенного GTX III, предварительно подтверждена его подлинность методом ИК-спектроскопии, далее это соединение будет проанализировано методами  $^{13}\text{C}$  ЯМР,  $^1\text{H}$  ЯМР и масс-спектрометрии.

2. В связи с отсутствием стандартного образца СТХ III полученная субстанция после более глубокой доочистки может быть использована как отечественный стандартный образец в аналитических, токсикологических и фармакологических исследованиях.

3. Поскольку в эксперименте использовали сырье с подтвержденной видовой принадлежностью, то полученный GTX III как маркерное соединение можно использовать для анализа динамики накопления грайанотоксинов в листьях рододендрона желтого, произрастающего на территории РФ.

4. На следующем этапе исследований планируется изучить грайанотоксины листьев и цветков рододендрона кавказского, произрастающего на территории РФ. Сравнительный анализ результатов такого эксперимента позволит выбрать оптимальное производящее растение и вид сырья для получения субстанций GTX в РФ.

**Финансирование**

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Пятигорского медико-фармацевтического института. Никаких дополнительных грантов на проведение или руководство данным конкретным исследованием получено не было.

**Конфликт интересов**

Авторы данной работы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

**Открытый доступ**

Эта статья распространяется на условиях международной лицензии Creative Commons Attribution 4.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), которая разрешает неограниченное использование, распространение и воспроизведение на любом носителе при условии, что вы дадите соответствующие ссылки на автора(ов) и источник и предоставите ссылку на Лицензию Creative Commons и укажете, были ли внесены изменения.

**Список литературы**

1. Жаворонкова М.Е., Фурса Н.С., Белоусов М.В. Содержание арбутина в листьях некоторых видов рода рододендрон // Российский медико-биологический вестник им. академика И.П. Павлова. 2008. №2. С. 91–94.
2. Jaiswal R., Jayasingheb L., Kuhnert N. Identification and characterization of proanthocyanidins of 16 members of the *Rhododendron* genus (*Ericaceae*) by tandem LC-MS // Journal of Mass Spectrometry. 2012. Vol. 47. Pp. 502–515. DOI: 10.1002/jms.2954.
3. Liu L., Zhang L.Y., Wang S.L., Niu X.Y. Analysis of anthocyanins and flavonols in petals of 10 *Rhododendron* species from the Sygera Mountains in Southeast Tibet // Plant Physiology and Biochemistry. 2016. Pp. 250–256. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.03.036.
4. Карпова Е.А., Каракулов А.В. Флаваноиды некоторых видов рода *Rhododendron* L. флоры Сибири и Дальнего Востока // Химия растительного сырья. 2013. №2. С. 119–126.
5. Минович В.М., Федосеева Г.М., Бочарова Г.И., Чепогужева А.В. Динамика содержания флавоноидов и дубильных веществ в надземных органах рододендрона даурского // Экспериментальные исследования. 2005. №6. С. 149–152.
6. Буданцев А.Л. Растительные ресурсы России: Дикорастущие цветковые растения, их компонентный состав и биологическая активность. Семейства *Actinidiaceae–Malvaceae*, *Euphorbiaceae–Haloragaceae*. СПб.; М., 2009. С. 41–50.
7. Оганесян Э.Т., Бандюкова В.А., Шинкаренко А.Л. Флавонолы *Rhododendron luteum* и *Rh. dauricum* // Химия природных соединений. 1967. №4. С. 279.
8. Cao Y., Chu Q., Ye J. Chromatographic and electrophoretic methods for pharmaceutically active compounds in *Rhododendron dauricum* // Journal of Chromatography B. 2004. Vol. 812 (1-2). Pp. 231–240. DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.06.048.
9. Карпова Е.А., Каракулов А.В. Фенольные соединения близкородственных видов рода *Rhododendron* L. (*Ericaceae*) // Хромосомные числа и хемосистематика. 2011. Т. 14, №3. С. 145–149.
10. Морозова Ю.А., Суботялов М.А. Биологическая активность и компонентный состав некоторых видов рода *Rhododendron* флоры России // Растительные ресурсы. 2018. Т. 54, №3. С. 347–360.
11. Shrestha A., Hakeem Said I., Grimbs A., Thielen N., Lansing L., Schepker H., Kuhnert N. Determination of hydroxycinnamic acids present in *Rhododendron* species // Phytochemistry. 2017. Pp. 216–225. DOI: 10.1016/j.phytochem.2017.09.018.
12. Qiang Y., Zhou B., Gao K. Chemical constituents of plants from the genus *Rhododendron* // Chemistry & Biodiversity. 2011. Pp. 792–815. DOI: 10.1002/cbdv.201000046.
13. Zhang Z., Yan H., Zhu Y., Zhang H., Chai L., Li L., Wang X., Liu Y., Li Y. New lignans, sesquiterpenes and other constituents from twigs and leaves of *Rhododendron micranthum* // Fitoterapia. 2019. Pp. 15–21. DOI: 10.1016/j.fitote.2019.03.025.
14. Кукина Т.П., Елшин И.А., Сальникова О.И., Колосов П.В., Сандаг Ц., Каракай Д.А., Бондарева М.А., Нефедов А.А., Чиркова В.Ю., Шарлаева Е.А., Беленькая С.В., Щербаков Д.Н. Состав липофильных компонентов эфирного экстракта Рододендрона Адамса и активность против основной протеазы SARS-COV-2 // Химия растительного сырья. 2022. №4. С. 153–162. DOI: 10.14258/jcprm.20220411584.
15. Li C.H., Zhang J.Y., Zhang X.Y., Li S.H., Gao J.M. An overview of grayanane diterpenoids and their biological activities from the *Ericaceae* family in the last seven years // European Journal of Medicinal Chemistry. 2019. Vol. 166. Pp. 400–416. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.01.079.
16. Cal Y.Q., Hu J.H., Qin J., Sun T., Li X.L. *Rhododendron molle* (*Ericaceae*): phytochemistry, pharmacology, and toxicology // Chinese Journal of Natural Medicin. 2018. Vol. 16(6). Pp. 401–410. DOI: 10.1016/S1875-5364(18)30073-6.
17. Белова Н.В. Андромедотоксин и его получение из *Rhododendron* L. // Растительные ресурсы. 1971. Т. 7, №4. С. 574.
18. Zhang H.P., Wang H.B., Wang L.Q., Bao G.H., Qin G.W. A new 1,5-seco grayanotoxin from *Rhododendron decorum* // Journal of Asian Natural Products Research. 2005. Vol. 7(1). Pp. 87–90. DOI: 10.1080/10286020310001609001.



19. Sun N., Qiu Y., Zhu Y., Liu J., Zhang H., Zhang Q., Zhang M., Zheng G., Zhang C., Yao G. Rhodomicranosides A–I, analgesic diterpene glucosides with diverse carbon skeletons from *Rhododendron micranthum* // *Phytochemistry*. 2019. Vol. 158. Pp. 1–12. DOI: 10.1016/j.phytochem.2018.10.017.
20. Ku D.D., Akera T., Frank M., Brody T.M., Iwasa J. The effects of grayanotoxin I and alpha-dihydrograyanotoxin II on guinea-pig myocardium // *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1977. Vol. 200(2). Pp. 363–372.
21. Okuyan E., Uslu A., Levent M.O. Cardiac effects of “mad honey”: a case series cardiac effects of mad honey // *Clinical Toxicology*. 2010. Vol. 48(6). Pp. 528–532. DOI: 10.3109/15563650.2010.497150.
22. Gunduz A., Eraydin I., Turkmen S., Kalkan O.F., Turedi S., Eryigit U., Ayar A. Analgesic effects of mad honey (grayanotoxin) in mice models of acute pain and painful diabetic neuropathy // *Human & Experimental Toxicology*. 2014. Vol. 33(2). Pp. 130–135. DOI: 10.1177/0960327113482693.
23. Siitliiplnar N., Mat A., Satganolu Y. Poisoning by toxic honey in Turkey // *Archives of Toxicology*. 1993. Vol. 67. Pp. 148–150. DOI: 10.1007/bf01973687.
24. Yilmaz O., Eser M., Sahiner A., Altintop L., Yesildag O. Hypotension, bradycardia and syncope caused by honey poisoning // *Resuscitation*. 2006. Vol. 68(3). Pp. 405–408. DOI: 10.1016/j.resuscitation.2005.07.014.
25. Koda R., Honma M., Suzuki K., Kasai A., Takeda T., Narita I., Yoshida K. Hypotension and bradycardia caused by the inadvertent ingestion of *Rhododendron japonicum* // *Internal Medicine*. 2015. Vol. 55(7). Pp. 839–842. DOI: 10.2169/internalmedicine.55.6144.
26. Schrenk D., Bignami M., Bodin L., Chipman J.K., Mazo J.D. Risks for human health related to the presence of grayanotoxins in certain honey // *EFSA Journal*. 2023. Vol. 21(3). P. 121. DOI: 10.2903/j.efsa.2023.7866.
27. Sun N., Zheng G., He M., Feng Y., Liu J., Wang M., Zhang H., Zhou J., Yao G. Grayanane diterpenoids from the leaves of *Rhododendron auriculatum* and their analgesic activities // *Journal of Natural Products*. 2019. Vol. 82 (7). Pp. 1849–1860. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b00095.
28. Тишина А.Н. Аналитическое обоснование выбора экстрагента и условий экстракции грайанотоксинов рододендрона желтого (*Rhododendron luteum* Sweet) // *Флагман науки*. 2023. №4. С. 860–871.
29. Государственная фармакопея РФ. XIV изд. М., 2018. URL: <https://zdravmedinform.ru/farmakopeia/ofs.1.5.3.0007.15.html>.
30. Milne R. *Rhododendron*. London, 2017. 236 p.
31. Liu C.C., Lei C., Zhong Y., Gao L.X., Li J.Y., Yu M.H., Li J., Hou A.J. Novel grayanane diterpenoids from *Rhododendron principis* // *Tetrahedron*. 2014. Vol. 70 (29). Pp. 4317–4322. DOI: 10.1016/j.tet.2014.05.019.
32. Zhu Y., Yan H., Wang X., Zhang Z., Zhang H., Chai L., Li L., Qu J., Li Y. Micranthanosides I and II, two novel 1,10-secograyanane diterpenoids and their antinociceptive analogues from the leaves and twigs of *Rhododendron micranthum* // *The royal society of chemistry*. 2019. Vol. 9(32). Pp. 18439–18450. DOI: 10.1039/c9ra01736d.
33. Li Y., Liu Y.B., Zhang J.J., Liu Y., Ma S.G., Qu J., Lv H.N., Yu S.S. Antinociceptive grayanoids from the roots of *Rhododendron molle* // *Journal of natural products*. 2015. Vol. 78(12). Pp. 2887–2895. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00456.
34. Wang W.G., Wu Z.Y., Chen R., Li H.Z., Li H.M., Li Y.D., Li R.T., Luo H.R. Pierisformotoxins A–D, polyesterified grayanane diterpenoids from *Pieris formosa* and their cAMP-decreasing activities // *Chemistry & Biodiversity*. 2013. Vol. 10(6). Pp. 1061–1071. DOI: 10.1002/cbdv.201200046.
35. Chen S.N., Zhang H.P., Wang L.Q., Bao G.H., Qin G.W. Diterpenoids from the flowers of *Rhododendron molle* // *Journal of natural products*. 2004. Vol. 67(11). Pp. 1903–1906. DOI: 10.1021/np040012o.
36. Poon W.T., Ho C.H., Yip K.L., Lai C.K., Cheung K.L., Sung R.Y.T., Chan A.Y.W., Mak T.W.L. Grayanotoxin poisoning from *Rhododendron simsii* in an infant // *Hong Kong Medical Journal*. 2008. Vol. 14(5). Pp. 405–407.
37. Belova N.V. Andromedotoxin in rhododendrons // *Chemistry of Natural Compounds*. 1970. Vol. 6(3). Pp. 388–389. DOI: 10.1007/BF00567356.
38. Jawad F.H., Kinghorn A.D., Doorenbos N.J., Billets S. Characterization and mass spectral analysis of some grayanotoxin derivatives // *Biomedical Mass Spectrometry*. 1977. Vol. 4(6). Pp. 331–336. DOI: 10.1002/bms.1200040603.
39. El-Naggar S.F., Doskotch R.W., Odell T.M., Girard L. Antifeedant diterpenes for the gypsy moth larvae from *Kalmia latifolia*: isolation and characterization of ten grayanoids // *Journal of Natural Products*. 1980. Vol. 43(5). Pp. 617–630. DOI: 10.1021/np50011a016.
40. Burke J.W., Doskotch R.W. High field <sup>1</sup>H- AND <sup>13</sup>C-NMR assignments of grayanotoxins I, IV, and XIV isolated from *Kalmia angustifolia* // *Journal of Natural Products*. 1990. Vol. 53(1). Pp. 131–137. DOI: 10.1021/np50067a017.
41. Наканиси К. Инфракрасные спектры и строение органических соединений. М., 1965. 216 с.
42. Беллами Л. ИК-спектры сложных молекул. М., 1963. 444 с.

Поступила в редакцию 21 апреля 2023 г.

После переработки 5 ноября 2023 г.

Принята к публикации 30 января 2024 г.

Tishina A.N.<sup>\*</sup>, Pechinskii S.V., Kuregyan A.G. RESEARCH OF THE LEAVES OF *RHODODENDRON LUTEUM* SWEET AS A SOURCE OF GRAYANOTOXIN III

Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute - branch of the Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education VolgGMU, Kalinina av., 11, Pyatigorsk, 357532, Russia, al.tishinatishina@yandex.ru

Grayan diterpenoids are a group of secondary metabolites of the *Ericaceae* family that deserve special attention, because their biosynthesis, in particular in rhododendrons, has a chemotaxonomic unity and species specificity. Leaves of yellow rhododendron (*Rhododendron luteum* Sweet), growing in the territory of the Russian Federation, have not been previously considered as a source of obtaining individual grayanotoxins (GTX). The purpose of the study is to study the leaves of yellow rhododendron as a source of GTX III. The methods of liquid extraction, IR spectrometry, UV spectrophotometry, column chromatography, HPLC were used in the work. According to the results of the experiment, the conditions for obtaining GTX III from the leaves of yellow rhododendron were chosen - this is a combination of the liquid extraction method (extractant - ethyl alcohol 95%; hydromodule - 1 : 10; number of extraction stages - 2; extraction time at each stage - 2 hours with a reflux condenser; extraction temperature - 78±2 °C) and column chromatography (stationary phase - silica gel-60 for chromatography; mobile phase for elution "chloroform-methanol 9 : 1"; volume of each fraction - 10 ml). Precipitation of the target compound was carried out from fraction 14 at a temperature of -20 °C for 24 hours. Under the conditions described, one Grayan-type compound with a melting point of 219 °C was obtained, having a retention time of about 48 minutes under HPLC analysis conditions. As a result of analysis by IR spectrometry, it was found that the resulting compound is GTX III.

**Keywords:** yellow rhododendron, grayanotoxin III, yellow rhododendron leaves, liquid extraction, column chromatography, melting point, IR spectrometry, HPLC.

**For citing:** Tishina A.N., Pechinskii S.V., Kuregyan A.G. *Khimiya Rastitel'nogo Syr'ya*, 2024, no. 2, pp. 226–236. (in Russ.). DOI: 10.14258/jcprm.20240212899.

### References

- Zhavoronkova M.Ye., Fursa N.S., Belousov M.V. *Rossiyskiy mediko-biologicheskiy vestnik im. akademika I.P. Pavlova*, 2008, no. 2, pp. 91–94. (in Russ.).
- Jaiswal R., Jayasingheb L., Kuhnert N. *Journal of Mass Spectrometry*, 2012, vol. 47, pp. 502–515. DOI: 10.1002/jms.2954.
- Liu L., Zhang L.Y., Wang S.L., Niu X.Y. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2016, pp. 250–256. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.03.036.
- Karpova Ye.A., Karakulov A.V. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2013, no. 2, pp. 119–126. (in Russ.).
- Mirovich V.M., Fedoseyeva G.M., Bocharova G.I., Chepoguzova A.V. *Ekspperimental'nyye issledovaniya*, 2005, no. 6, pp. 149–152. (in Russ.).
- Budantsev A.L. *Rastitel'nyye resursy Rossii: Dikorastushchiye tsvetkovyye rasteniya, ikh komponentnyy sostav i biologicheskaya aktivnost'. Semeystva Actinidiaceae–Malvaceae, Euphorbiaceae–Haloragaceae*. [Plant resources of Russia: Wild flowering plants, their component composition and biological activity. Families Actinidiaceae–Malvaceae, Euphorbiaceae–Haloragaceae]. St. Petersburg; Moscow, 2009, pp. 41–50. (in Russ.).
- Oganesyan E.T., Bandyukova V.A., Shinkarenko A.L. *Khimiya prirodnikh soyedineniy*, 1967, no. 4, p. 279. (in Russ.).
- Cao Y., Chu Q., Ye J. *Journal of Chromatography B*, 2004, vol. 812 (1-2), pp. 231–240. DOI: 10.1016/j.jchromb.2004.06.048.
- Karpova Ye.A., Karakulov A.V. *Khromosomnyye chisla i khemosistematika*, 2011, vol. 14, no. 3, pp. 145–149. (in Russ.).
- Morozova Yu.A., Subotyalov M.A. *Rastitel'nyye resursy*, 2018, vol. 54, no. 3, pp. 347–360. (in Russ.).
- Shrestha A., Hakeem Said I., Grimbs A., Thielen N., Lansing L., Schepker H., Kuhnert N. *Phytochemistry*, 2017, pp. 216–225. DOI: 10.1016/j.phytochem.2017.09.018.
- Qiang Y., Zhou B., Gao K. *Chemistry & Biodiversity*, 2011, pp. 792–815. DOI: 10.1002/cbdv.201000046.
- Zhang Z., Yan H., Zhu Y., Zhang H., Chai L., Li L., Wang X., Liu Y., Li Y. *Fitoterapia*, 2019, pp. 15–21. DOI: 10.1016/j.fitote.2019.03.025.
- Kukina T.P., Yelshin I.A., Sal'nikova O.I., Kolosov P.V., Sandag Ts., Karakay D.A., Bondareva M.A., Nefedov A.A., Chirkova V.Yu., Sharlayeva Ye.A., Belen'kaya S.V., Shcherbakov D.N. *Khimiya rastitel'nogo syr'ya*, 2022, no. 4, pp. 153–162. DOI: 10.14258/jcprm.20220411584. (in Russ.).
- Li C.H., Zhang J.Y., Zhang X.Y., Li S.H., Gao J.M. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2019, vol. 166, pp. 400–416. DOI: 10.1016/j.ejmech.2019.01.079.
- Cal Y.Q., Hu J.H., Qin J., Sun T., Li X.L. *Chinese Journal of Natural Medicin*, 2018, vol. 16(6), pp. 401–410. DOI: 10.1016/S1875-5364(18)30073-6.
- Belova N.V. *Rastitel'nyye resursy*, 1971, vol. 7, no. 4, p. 574. (in Russ.).
- Zhang H.P., Wang H.B., Wang L.Q., Bao G.H., Qin G.W. *Journal of Asian Natural Products Research*, 2005, vol. 7(1), pp. 87–90. DOI: 10.1080/10286020310001609001.
- Sun N., Qiu Y., Zhu Y., Liu J., Zhang H., Zhang Q., Zheng G., Zhang C., Yao G. *Phytochemistry*, 2019, vol. 158, pp. 1–12. DOI: 10.1016/j.phytochem.2018.10.017.
- Ku D.D., Akera T., Frank M., Brody T.M., Iwasa J. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1977, vol. 200(2), pp. 363–372.

\* Corresponding author.

21. Okuyan E., Uslu A., Levent M.O. *Clinical Toxicology*, 2010, vol. 48(6), pp. 528–532. DOI: 10.3109/15563650.2010.497150.
22. Gunduz A., Eraydin I., Turkmen S., Kalkan O.F., Turedi S., Eryigit U., Ayar A. *Human & Experimental Toxicology*, 2014, vol. 33(2), pp. 130–135. DOI: 10.1177/0960327113482693.
23. Siitliiplnar N., Mat A., Satganolu Y. *Archives of Toxicology*, 1993, vol. 67, pp. 148–150. DOI: 10.1007/bf01973687.
24. Yilmaz O., Eser M., Sahiner A., Altintop L., Yesildag O. *Resuscitation*, 2006, vol. 68(3), pp. 405–408. DOI: 10.1016/j.resuscitation.2005.07.014.
25. Koda R., Honma M., Suzuki K., Kasai A., Takeda T., Narita I., Yoshida K. *Internal Medicine*, 2015, vol. 55(7), pp. 839–842. DOI: 10.2169/internalmedicine.55.6144.
26. Schrenk D., Bignami M., Bodin L., Chipman J.K., Mazo J.D. *EFSA Journal*, 2023, vol. 21(3), p. 121. DOI: 10.2903/j.efsa.2023.7866.
27. Sun N., Zheng G., He M., Feng Y., Liu J., Wang M., Zhang H., Zhou J., Yao G. *Journal of Natural Products*, 2019, vol. 82 (7), pp. 1849–1860. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b00095.
28. Tishina A.N. *Flagman nauki*, 2023, no. 4, pp. 860–871. (in Russ.).
29. *Gosudarstvennaya farmakopeya RF. XIV izd.* [State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIV ed.]. Moscow, 2018. URL: <https://zdravmedinform.ru/farmakopeia/ofs.1.5.3.0007.15.html>. (in Russ.).
30. Milne R. *Rhododendron*. London, 2017, 236 p.
31. Liu C.C., Lei C., Zhong Y., Gao L.X., Li J.Y., Yu M.H., Li J., Hou A.J. *Tetrahedron*, 2014, vol. 70 (29), pp. 4317–4322. DOI: 10.1016/j.tet.2014.05.019.
32. Zhu Y., Yan H., Wang X., Zhang Z., Zhang H., Chai L., Li L., Qu J., Li Y. *The royal society of chemistry*, 2019, vol. 9(32), pp. 18439–18450. DOI: 10.1039/c9ra01736d.
33. Li Y., Liu Y.B., Zhang J.J., Liu Y., Ma S.G., Qu J., Lv H.N., Yu S.S. *Journal of natural products*, 2015, vol. 78(12), pp. 2887–2895. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00456.
34. Wang W.G., Wu Z.Y., Chen R., Li H.Z., Li H.M., Li Y.D., Li R.T., Luo H.R. *Chemistry & Biodiversity*, 2013, vol. 10(6), pp. 1061–1071. DOI: 10.1002/cbdv.201200046.
35. Chen S.N., Zhang H.P., Wang L.Q., Bao G.H., Qin G.W. *Journal of natural products*, 2004, vol. 67(11), pp. 1903–1906. DOI: 10.1021/np040012o.
36. Poon W.T., Ho C.H., Yip K.L., Lai C.K., Cheung K.L., Sung R.Y.T., Chan A.Y.W., Mak T.W.L. *Hong Kong Medical Journal*, 2008, vol. 14(5), pp. 405–407.
37. Belova N.V. *Chemistry of Natural Compounds*, 1970, vol. 6(3), pp. 388–389. DOI: 10.1007/BF00567356.
38. Jawad F.H., Kinghorn A.D., Doorenbos N.J., Billets S. *Biomedical Mass Spectrometry*, 1977, vol. 4(6), pp. 331–336. DOI: 10.1002/bms.1200040603.
39. El-Naggar S.F., Doskotch R.W., Odell T.M., Girard L. *Journal of Natural Products*, 1980, vol. 43(5), pp. 617–630. DOI: 10.1021/np50011a016.
40. Burke J.W., Doskotch R.W. *Journal of Natural Products*, 1990, vol. 53(1), pp. 131–137. DOI: 10.1021/np50067a017.
41. Nakanisi K. *Infrakrasnyye spektry i stroeniye organicheskikh soyedineniy*. [Infrared spectra and structure of organic compounds]. Moscow, 1965, 216 p. (in Russ.).
42. Bellami L. *IK-spektry slozhnykh molekul*. [IR spectra of complex molecules]. Moscow, 1963, 444 p. (in Russ.).

Received April 21, 2023

Revised November 5, 2023

Accepted January 30, 2024

#### Сведения об авторах

Тишина Алёна Николаевна – соискатель кафедры фармацевтической химии, [al.tishinatishina@yandex.ru](mailto:al.tishinatishina@yandex.ru)

Печинский Станислав Витальевич – кандидат фармацевтических наук, доцент кафедры фармацевтической химии, [hplc@yandex.ru](mailto:hplc@yandex.ru)

Курегян Анна Гургеновна – доктор фармацевтических наук, профессор кафедры фармацевтической химии, [Kooreguan@mail.ru](mailto:Kooreguan@mail.ru)

#### Information about authors

Tishina Alena Nikolaevna – applicant for the Department of Pharmaceutical Chemistry, [al.tishinatishina@yandex.ru](mailto:al.tishinatishina@yandex.ru)

Pechinsky Stanislav Vitalievich – Candidate of Pharmaceutical Sciences, Associate Professor of the Department of Pharmaceutical Chemistry, [hplc@yandex.ru](mailto:hplc@yandex.ru)

Kuregyan Anna Gurgenovna – Doctor of Pharmaceutical Sciences, Professor of the Department of Pharmaceutical Chemistry, [Kooreguan@mail.ru](mailto:Kooreguan@mail.ru)