

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение  
высшего образования «Сибирский государственный медицинский  
университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

---

*На правах рукописи*

**Решетов Ярослав Евгеньевич**

**СОСЮРЕЯ СПОРНАЯ (*SAUSSUREA CONTROVERSA* DC.) –  
ПЕРСПЕКТИВНЫЙ ИСТОЧНИК СРЕДСТВА ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ  
ОСТЕОМИЕЛИТА**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Диссертация на соискание ученой степени  
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:

кандидат фармацевтических наук,  
доцент Авдеева Елена Юрьевна

Научный консультант:

доктор фармацевтических наук,  
доцент Белоусов Михаил Валерьевич

Томск – 2020

## ОГЛАВЛЕНИЕ

<b>ВВЕДЕНИЕ</b> .....	7
<b>Глава 1. Обзор литературы: перспективы использования растений в комплексной терапии остеомиелита</b>	
1.1. Опыт и перспективы использования растений для лечения остеомиелита .....	14
1.2. Характеристика <i>S. controversa</i> DC. в общей картине рода <i>Saussurea</i> .....	22
<b>Глава 2. Объекты и методы исследования</b>	
2.1. Объекты исследования .....	32
2.2. Стандартные образцы, реактивы и растворители.....	33
2.3. Методы общего фитохимического анализа на группы БАВ в листьях <i>S. controversa</i> DC.....	35
2.4. Методы исследования полисахаридов <i>S. controversa</i> DC.....	38
2.4.1. Выделение и очистка.....	38
2.4.2. Определение молекулярно-массового распределения.....	38
2.4.3. Определение содержания белка .....	39
2.4.4. Определение урсоловых кислот .....	39
2.4.5. Получение ацетатов полиолов .....	39
2.4.6. Определение мономерного состава .....	40
2.5. Получение и фракционирование экстракта на 40% этаноле.....	40
2.5.1. Хроматографический анализ экстракта и его фракций.....	40
2.5.2. Выделение и установление структуры индивидуальных соединений .....	42
2.6. Методы морфолого-анатомического исследования .....	43
2.7. Определение показателей качества растительного сырья.....	43
2.8. Методы биологических исследований .....	44
2.8.1. Исследование острой токсичности .....	44
2.8.2. Исследование иммуностропной активности.....	44
2.8.3. Исследование остеогенной активности .....	46

2.9.	Статистическая обработка результатов .....	46
------	--	----

### **Глава 3. Исследование химического состава листьев**

#### ***S. controversa* DC.**

3.1.	Общий фитохимический анализ на основные группы БАВ.....	47
3.2.	Выделение и характеристика полисахаридов.....	54
3.2.1.	Выделение полисахаридных фракций.....	54
3.2.2.	Определение молекулярно-массового распределения .....	55
3.2.3.	Определение содержания белка в полисахаридах.....	56
3.2.4.	Определение урсоловых кислот и моносахаридного состава.....	56
3.3.	Получение, фракционирование и установление компонентного состава экстракта листьев <i>S.controversa</i> DC. на 40% этаноле.....	59
3.3.1.	Получение и фракционирование экстракта.....	59
3.3.2.	Хроматографический анализ экстракта и фракций.....	61
3.3.3.	Исследование бутанольной фракции экстракта.....	68
3.3.4.	Исследование водного остатка экстракта .....	73

### **Глава 4. Исследование биологической активности экстракта листьев**

#### ***S.controversa* DC. на 40% этаноле и его компонентов**

4.1.	Исследование острой токсичности.....	78
4.2.	Изучение остеогенной активности.....	81
4.3.	Исследование иммуностропной активности .....	84

### **Глава 5. Разработка методик стандартизации листьев**

#### ***S.controversa* DC.**

5.1.	Морфолого-анатомическое исследование листьев <i>S.controversa</i> DC.....	87
5.2.	Разработка товароведческих показателей качества сырья.....	95
5.3.	Разработка и валидация методик качественного и количественного определения целевых БАВ в листьях <i>S.controversa</i> DC.....	98
5.3.1.	Пробоподготовка анализа.....	100
5.3.2.	Методики качественного обнаружения целевых БАВ.....	100

5.3.3. Методики количественного определения целевых БАВ.....	101
5.3.3.1. Количественное определение хелидоновой кислоты.....	101
5.3.3.2. Количественное определение флавоноидов.....	105
5.3.3.3. Количественное определение полисахаридов.....	108
<b>ВЫВОДЫ.....</b>	<b>114</b>
<b>СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....</b>	<b>116</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 1.....</b>	<b>138</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 2.....</b>	<b>171</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 3.....</b>	<b>177</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 4.....</b>	<b>182</b>
<b>ПРИЛОЖЕНИЕ 5.....</b>	<b>187</b>

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

БФ – бутанольная фракция

БХ – бумажная хроматография

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ВО – водный остаток

ВРПС – водорастворимые полисахариды

ГЖХ – газожидкостная хроматография

ГХ/МС – газовая хроматография/масс-спектрометрия

ЖАК – железоаммонийные квасцы

ИК – инфракрасный

кДа – килодальтон

КХ – колоночная хроматография

МГц – мегагерц

мкМ – микромоль

М.м. – молекулярная масса

ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

НД – нормативная документация

ОБФ – осадок из бутанольной фракции экстракта

ПВ – пектиновые вещества

ПС – полисахариды

ПССЭ – сумма полисахаридов из спиртового экстракта

РСО – рабочий стандартный образец

Т. пл. – температура плавления

ТСХ – тонкослойная хроматография

ТФУ – трифторуксусная кислота

ФПВ – фракция пектиновых веществ

ФПС – фракция полисахаридов

ЭАФ – этилацетатная фракция

ЭВ – экстрактивные вещества

эВ – электронвольт

УФ – ультрафиолетовый

ХЛФ – хлороформная фракция

ЯМР – ядерный магнитный резонанс

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность исследования.** Остеомиелит (ОМ) - воспалительный процесс костной ткани и костного мозга, вызванный бактериальной флорой. ОМ является острой медицинской и социальной проблемой. Частота случаев ОМ у людей с заболеваниями опорно-двигательного аппарата превышает 70%, при этом рецидивы наступают в 20-35% случаев, что приводит к повторным оперативным вмешательствам с высоким риском инвалидизации [55, 136].

Ключевыми звеньями патогенеза ОМ являются иммуносупрессия, воспаление и резорбция костной ткани. Стандарт лечения ОМ включает хирургическую санацию и консервативную терапию антибиотиками, сочетанную с иммуномодулирующими и нестероидными противовоспалительными средствами [69].

Комплексы биологически активных веществ (БАВ) растительного происхождения имеют ряд ценных терапевтических качеств, особенно при их использовании в комплексной терапии хронических патологий, за счет системного полимодального терапевтического действия, повышения адаптивного ресурса организма, высокого терапевтического индекса и низкого уровня побочных эффектов. Одним из перспективных направлений лечения ОМ является изыскание растительных источников БАВ, действующих на процессы репарации костной ткани, в сочетании с иммуномодулирующей и противовоспалительной активностью [104, 133, 151]. В данном аспекте представляет интерес сосюра спорная (*Saussurea controversa* DC., род *Saussurea* DC.), произрастающая на территории РФ и успешно применяемая в народной медицине Сибири для лечения ОМ. Учитывая значительный ресурсный потенциал *S. controversa* [148], возможность интродукции [77], применение в народной медицине в качестве противовоспалительного, иммуностропного, ранозаживляющего средства [84,85], а так же, результаты предварительных экспериментальных исследований [1,3,59], данный растительный объект можно считать

перспективным кандидатом для комплексного фармацевтического исследования. А изучение химического состава, фармакологических свойств БАС с последующей разработкой нормативной документации (НД) на лекарственное растительное сырье для комплексной терапии остеомиелита является актуальным.

### **Степень разработанности темы исследования.**

Ранее исследован химический состав и биологическая активность близкородственных с *S. controversa* видов – с. иволистной (*S. salicifolia* L.) и с. горькой (*S. amara* L.). В траве с. иволистной обнаружены кумарины (умбеллиферон, эскулетин, скополетин); фенолокислоты (кофейная кислота); флавоноиды (кверцетин, апигенин, гиперозид); сесквитерпеновые лактоны (янерин, репин, цебеллин G, цинаропикрин). Установлена противоописторхозная и противолямблиозная активность этанольных экстрактов травы с. иволистной [57]. В надземной части с. горькой обнаружены фенолкарбоновые кислоты (кумаровая, коричная, изованилиновая, галловая кислоты); флавоноиды (рутин, кверцетин, лютеолин, мирицетин); кумарины (эскулин, эскулетин, хаплоперозид A, фраксетин, обтусинин); сесквитерпеновые лактоны (гроссгемин, репин, цинаропикрин) [61]. Установлена противоописторхозная и гепатопротекторная активность этанольных экстрактов надземной части с. горькой [62]. В то же время, химический состав с. спорной (*S. controversa* DC.) мало изучен. В литературных источниках имеются сведения о содержании полисахаридов, флавоноидов [2,4,5] терпеноидах и фенилпропаноиде сиригине [83]. Из метанольного экстракта надземной части (без цветоносов) *S. controversa* были выделены н-алканы C<sub>23</sub>-C<sub>31</sub>, β-ситостерин, стигмастерин, кампестерин, кверцетин, рутин [84]. В экспериментальных исследованиях *in vivo* выявлены остеогенная и иммуностимулирующая активность *S. controversa* [1, 3, 6, 59]. Сведения о морфолого-

анатомическом строении вегетативных органов *S. controversa* и биологической активности её БАВ отсутствуют в литературе.

Поскольку известно влияние фенольных соединений и полисахаридов некоторых растений на остеогенез [91, 104, 123, 167], а в фармакопее РФ не представлены виды лекарственного растительного сырья, обладающие сочетанными остеогенными и иммуностропными свойствами, поиск перспективных источников, эффективных в комплексной терапии ОМ является актуальным направлением исследования.

**Целью** исследования явилось комплексное фармакогностическое исследование надземной части *S. controversa* DC. для выявления групп БАВ, обладающих остеогенной и иммуностропной активностью и стандартизация сырья для разработки проекта ФС «Соссюреи спорной листья».

Для достижения указанной цели, был сформирован ряд **задач**:

- 1) На основании анализа литературных данных обосновать выбор объекта и дизайна исследования.
- 2) Провести исследование химического состава листьев *S. controversa*, и экстракта на 40% этаноле, эффективного на модели экспериментального травматического остеомиелита.
- 3) Выявить индивидуальные соединения и группы БАВ листьев *S. controversa*, обладающие остеогенными и иммуностропными свойствами в моделях *in vitro*.
- 4) Провести морфолого-анатомическое исследование листьев *S. controversa*.
- 5) Разработать и валидировать методики стандартизации сырья «Соссюреи спорной листья».
- 6) Составить проект фармакопейной статьи на лекарственное растительное сырье «Соссюреи спорной листья».

**Научная новизна.** В результате фитохимического исследования *S. controversa* DC. идентифицировано 20 веществ различной химической природы, из которых 11 описаны для данного вида впервые (хлорогеновая,

хинная, салициловая, урсоловая кислоты, дигидрокверцетин, умбеллиферон, валин, аргинин, треонин, лизин, глицин). Впервые исследован компонентный состав эфирного масла, идентифицировано 52 соединения. Препаративно выделены мажорные фармакологически активные компоненты экстракта *S. controversa* DC на 40% этаноле: полисахариды, гликозиды кверцетина (7-О- $\alpha$ -L-рамнозид-3-О- $\beta$ -D-глюкозид кверцетина, 3-О- $\beta$ -D-диглюкозид-О- $\alpha$ -L-рамнозид кверцетина, рутин), хелидоновая кислота. Впервые охарактеризован полисахаридный комплекс *S. controversa* DC. Разработаны и валидированы методики стандартизации и установлены основные диагностические признаки сырья. Впервые определены: острая токсичность, остеогенная и иммуностропная активность целевых компонентов экстракта листьев *S. controversa* DC. на 40% этаноле *in vitro* с использованием клеточных технологий. Впервые определено влияние компонентов экстракта листьев *S. controversa* на NO-синтазную активность макрофагов.

**Теоретическая и практическая значимость.** Разработан проект ФС на сырье «Соссюреи спорной листья». Получен патент на средство для стимуляции роста клеток гранулоцитарного и лимфоидного ряда в костном мозге и регенерации костной ткани. Научно обосновано применение экстракта листьев *S. controversa* в комплексном лечении остеомиелита, а также в качестве лекарственного растительного сырья с остеогенной и иммуностропной активностью. Для целей стандартизации обоснован выбор методик количественного определения целевых групп БАВ: полисахаридов, флавоноидов, хелидоновой кислоты.

**Степень внедрения.** Результаты экспериментальных исследований, а также теоретические положения, изложенные в диссертационной работе, используются в учебном процессе кафедр фармацевтического анализа и фармакогнозии с курсами ботаники и экологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

**На защиту выносятся:**

- Результаты исследования химического состава листьев *S. controversa* и экстракта на 40% этаноле, эффективного на модели экспериментального травматического остеомиелита.
- Результаты исследования острой токсичности; остеогенной и иммуностропной активности индивидуальных соединений и групп БАВ листьев *S. controversa* на моделях *in vitro*.
- Результаты морфолого-анатомического исследования листьев *S. controversa* DC.
- Результаты разработки и валидации методик стандартизации сырья для внесения в проект ФС «Сосюреи спорной листья»

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность диссертационного исследования подтверждена экспериментальными данными, полученными с использованием современных химических и физико-химических методов (ГЖХ, ВЭЖХ, УФ-, ИК-, ЯМР-спектроскопии, масс-спектрометрии). Результаты исследований статистически обработаны при помощи программ Microsoft Office Excel 2007, Statistica 6.0 2006 с использованием критериев Стьюдента и Манна-Уитни.

Основные положения и результаты работы представлены на IV научно-практической конференции «Молодые учёные и фармация XXI века» (Москва, 2016), XIV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Перспективы развития фундаментальных наук» (Томск, 2017). 12-th International symposium on the chemistry of natural compounds (Tashkent, 2017), XXIV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (Москва, 2017), X Международном симпозиуме «Фенольные соединения: фундаментальные и прикладные аспекты» (Москва, 2018).

**Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук.** Работа выполнена в соответствии планом научно-исследовательских работ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный

медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации «Изыскание и изучение новых лекарственных средств. Вопросы фармации» (№ гос. регистрации темы 01.02.00. 101708) и комплексной программой «Инновационные технологии новых фармацевтических продуктов на основе природных биологически активных комплексов» (регистрационный номер: АААА-А16-116021010208-2 от 10.02.2016 г).

**Личный вклад автора в проведенное исследование и получение научных результатов.** Автор принимал непосредственное участие в планировании и осуществлении всех этапов экспериментальной работы: лично проводил экспериментальные исследования, выполнял сбор, анализ и статистическую обработку данных. Автором подготовлены доклады, тезисы, рукописи статей, а также диссертация и автореферат, представленные к защите.

**Соответствие диссертации паспорту научной специальности.**

Диссертация соответствует паспорту специальности 14.04.02. – фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно области исследований, соответствующей: п. 2 – формулирование и развитие принципов стандартизации и установление нормативов качества, обеспечивающих терапевтическую активность и безопасность лекарственных средств; п. 3 – разработка новых, совершенствование, унификация и валидация существующих методов контроля качества лекарственных средств на этапах их разработки, производства и потребления; п. 6 – изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе.

**Публикации.** По результатам диссертационной работы опубликовано 19 работ: 9 статей в изданиях, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, в том числе 7 работ по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, из которых 4 работы входят в базы цитирования SCOPUS; 1

патент РФ на изобретение и 5 тезисов докладов на международных и всероссийских конференциях.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 188 страницах машинописного текста, содержит 42 таблицы и 34 рисунка; состоит из введения, пяти глав, выводов и заключения, списка использованных литературных источников, включающего 170 наименований, 5 приложений.

# ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ:

## ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ РАСТЕНИЙ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ ОСТЕОМИЕЛИТА

### 1.1. Опыт и перспективы использования растений для лечения остеомиелита

Терапия патологий костной ткани, в т.ч. инфекционной природы, является важной медико-социальной проблемой. Одной из таких патологий является остеомиелит – инфекционный воспалительный процесс, поражающий все элементы кости: костный мозг, компактную и губчатую части кости и надкостницу.

Одним из древнейших свидетельств заболевания остеомиелитом является перелом позвоночника диметродона – хищного ящера существовавшего 250 миллионов лет назад в Пермском периоде. Шероховатость кости, опухоль, выше места перелома, а также трещины в пораженной кости свидетельствуют об обширном воспалительном процессе, что дополнительно подтверждено гистологическими исследованиями [141].

На протяжении многих столетий заболевание с трудом поддавалось лечению и зачастую приводило к смертельным исходам. Совершенствование хирургических приемов, концепция асептики, создание антибиотиков в 20 веке, привело к существенному прогрессу в терапии остеомиелита. В результате произошло значительное снижение смертности и частоты рецидивов болезни. Однако, несмотря на достигнутые успехи в травматологии, частота неблагоприятных результатов лечения переломов конечностей с развитием инфицирования остается высокой. Причиной этого является увеличение количества тяжелых механических травм, ошибки в выборе способа лечения, рост числа и устойчивость возбудителей ОМ, а также нарушение деятельности иммунной системы организма.

Возбудителем острого остеомиелита в 80-85% случаев являются патогенные стафилококки. В 11% случаев заболевание вызвано

метициллинрезистентным золотистым стафилококком, реже стрептококком и пневмококком [44]. Возрастает роль грамотрицательной флоры (около 6-7%), высокорезистентной к антибактериальным препаратам. Зачастую вместе со стафилококками в патогенезе участвуют синегнойная палочка, вульгарный протей, кишечная палочка, сальмонеллы, а также монокультуры клебсиеллы (капсульная форма) [18]. Кроме того возбудителями могут являться риккетсии и патогенные грибы. Важным этиологическим фактором острого гематогенного остеомиелита могут быть и вирусные инфекции, на фоне которых протекает почти 40-50% случаев остеомиелита. Вирусы снижают сопротивляемость организма, повышают вирулентность гноеродных бактерий и создают благоприятную почву для их внедрения [19,40]. Зачастую возбудители травматического и посттравматического остеомиелита представлены полимикробной флорой [22]. Схема патогенеза травматического остеомиелита согласно Гриневу М.В., обозначена на рисунке 1.

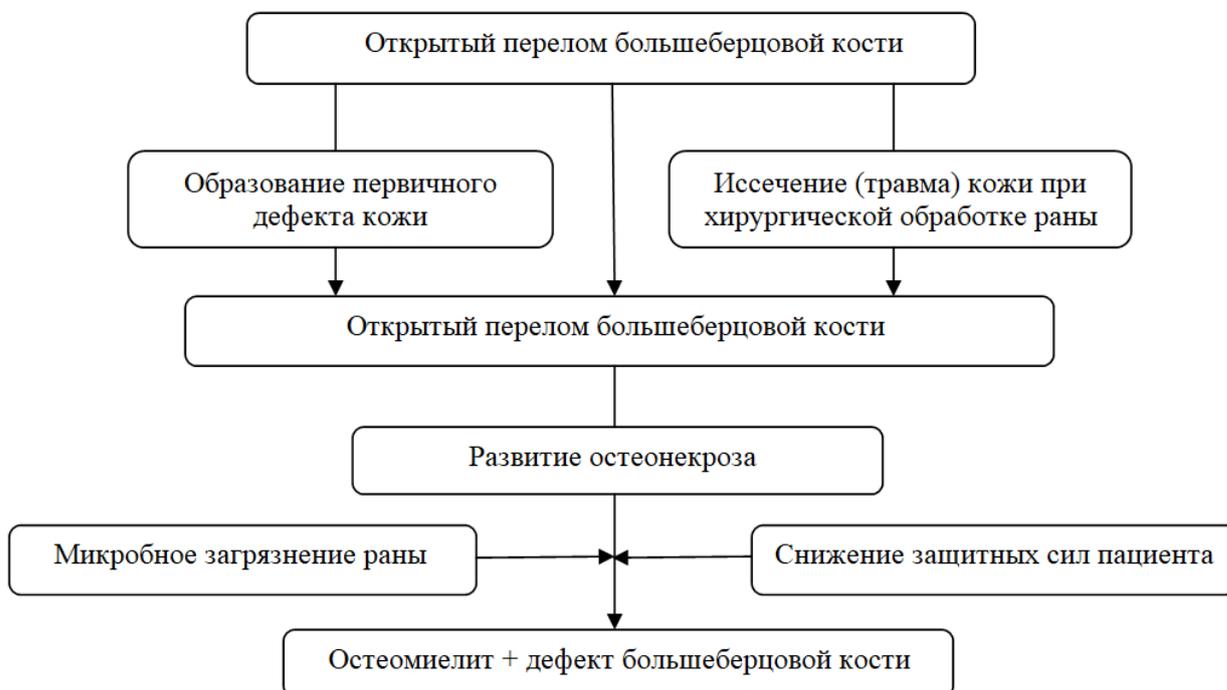


Рисунок 1 – Схема патогенеза травматического остеомиелита

Большое значение при данной патологии имеет иммунный ответ, причем как на клеточном, так и на гуморальном уровне. Обычно, при наличии очагов

гнойных инфекций, организм человека начинает вырабатывать антитела: иммуноглобулины (IgG, IgM, IgA) в определенных соотношениях (73:7:19). В соответствии с данным уровнем антител можно оценивать иммунологический статус больных остеомиелитом. Многими исследователями установлено отсутствие и/или подавление иммунного ответа при остеомиелите, что существенно сказывается на хронизации инфекции. Кроме того, выявлено, что у каждого второго пациента, нарушается дифференцировка макрофагов, что приводит к значительному ослаблению иммунологических реакций [97,111,145]. Нарушения минерального обмена при ОМ проявляются в изменении ряда показателей: снижение содержания сывороточного кальция, железа и хлоридов, увеличение меди, магния, значительное увеличение активности щелочной фосфатазы [72].

В настоящее время, рост травматизма, использование инвазивных методов (эндопротезирование, металлоостеосинтез) в лечении переломов приводит к увеличению числа больных с данной патологией [14,40,51]. Частота встречаемости ОМ у пациентов с заболеваниями опорно-двигательного аппарата составляет до 78 % лиц трудоспособного возраста [55]. Гнойно-воспалительные поражения костей являются тяжелыми и долго протекающими заболеваниями, приводящими к инвалидизации в 55 % случаев. При этом наблюдается тенденция к смещению от ограниченных форм заболевания в сторону более тяжелых проявлений.

Согласно стандартам оказания медицинской помощи при хирургических инфекциях [69], терапия данного заболевания проводится с помощью сочетанного применения лекарственных средств различных групп: антибиотиков, иммуномодуляторов, препаратов кальция, анальгетиков, нестероидных противовоспалительных средств, венопротекторов, витаминов [52,55]. Очевидно, что такая терапия обуславливает высокую ксенобиотическую нагрузку на организм, а полипрагмазия увеличивает риски

проявления нежелательных побочных реакций лекарственных средств. Проблема осложняется растущей антибиотикорезистентностью возбудителей ОМ. Последствия заболевания сопровождаются значительными экономическими затратами на лечение и пенсионное обеспечение пациентов.

Учитывая особенности заболевания, в качестве средств консервативной терапии перспективны лекарственные средства на основе природных биологически активных веществ, обладающие системным полимодальным терапевтическим действием, повышая адаптивный ресурс организма, относительно низкой токсичностью, высоким терапевтическим индексом и низким уровнем побочных эффектов [11].

Так, в качестве средств вспомогательной терапии остеомиелита в народной медицине используются различные виды растений (рисунок 2).



Рисунок 2 – Растения, используемые в народной медицине для лечения остеомиелита

Известно об употреблении внутрь спиртовой настойки цветков сирени, сока алоэ, водного настоя и сока листьев крапивы, в качестве средств,

значительно облегчающих течение болезни [10,31,41,82]. Популярным средством является отвар корней окопника, который применяют как внутрь, так и наружно [48,85]. Успешно применяется отвар сушеницы топяной для промывания свищевых ходов при ОМ, особенно в сочетании с отваром ромашки, 5% спиртовой настойкой календулы с добавлением спиртового раствора борной кислоты [85]. Соссюрея спорная также находит применение в народной медицине для лечения ОМ [82,85]. Экспериментально установлена иммуностропная активность водных и водно-этанольных экстрактов, полученных из надземной части растения [133].

Для выявления растений, перспективных для использования в комплексной терапии ОМ, определения наиболее значимых групп БАВ и фармакологических эффектов, нами проведена систематизация известных растительных и природных средств народной медицины, в сочетании с анализом химического состава по данным литературных источников (таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика видов растений применяемых в народной медицине для лечения остеомиелита

Вид растения	Семейство	Используемые части растений	Народное средство	Активные компоненты	Фармакологическое действие	Литература
Окопник лекарственный - <i>Symphytum officinale</i> L.	Бурачниковые <i>Boraginaceae</i>	Корни	Отвар корней на молоке для приема внутрь. В виде водных отваров в качестве примочек и для наружного применения.	Аллантоин; ВРПС (урониды фруктоарабианов); ПВ	Противо- воспалительное Стимулирующее регенерацию Иммуномодулирующее	[85, 96, 126]
Алоэ древовидное- <i>Aloe arborescens</i> Mill.	Асфоделовые <i>Asphodelaceae</i>	Листья	Свежий сок листьев в виде примочек для наружного применения	Биогенные элементы, органические кислоты, пиреновые соединения, ПС	Стимулятор обменных процессов, антиоксидантное, иммуно- стимулирующее действие	[58, 64, 74]
Сирень обыкновенная- <i>Syringa vulgaris</i> L.	Маслиновые <i>Oleaceae</i>	Цветки, почки	Спиртовая настойка цветков или почек, для внутреннего и наружного применения (в виде компрессов)	Фенилпропаноиды (сирингин), производные кофейной кислоты; Секоиридоиды	Противо- воспалительное, иммуномодулирующее, антиоксидантное	[15, 87, 90, 110, 157]
Календула лекарственная <i>Calendula officinalis</i> L.	Астровые <i>Asteraceae</i>	Цветки	Промывание свищей водным настоем (1:10) смешанного в равных частях с 3% раствором борной кислоты	ПС, флавоноиды, каротиноиды	Противо- воспалительное, Иммуномодулирующее	[27, 29, 86, 89]
Осина обыкновенная, <i>Populus tremula</i> L.	Ивовые <i>Salicaceae</i>	Кора	Настои и отвары. Наружные аппликации раствора золы коры осины	Фенологликозиды, биогенные элементы (Ca, Mg, K, Fe Mn, Zn, Cu)	Стимулятор обменных процессов, противо- воспалительное, антибактериальное	[9, 10, 28, 33]
Сушеница топяная <i>Gnaphalium uliginosum</i> L.	Астровые <i>Asteraceae</i>	Трава	Водный настой травы сушеницы для внутреннего употребления, масляные отвары для наружного применения в виде примочек	Флавоноиды (гнафалозиды); биогенные элементы (Ca, P, Fe, Mg, Cu); каротиноиды	Противо- воспалительное, противомикробное, стимулирующее грануляцию	[23, 56, 100, 148]

<p>Крапива двудомная <i>Urtica dioica L.</i></p>	<p>Крапивные <i>Urticaceae</i></p>	<p>Листья</p>	<p>Настой листьев, для внутреннего применения. Сок свежих листьев, для промывания свищевых ходов</p>	<p>ПС, фенолокислоты (сиринговая, синаповая, феруловая к-ты), флавоноиды, каротиноиды, токоферолы, биоэлементы (К, Са, Р, Mg, Fe, Cu)</p>	<p>Иммуно- модулирующее, противо- воспалительное, антиоксидантное</p>	<p>[16,79,140, 167]</p>
<p>Соссюрея спорная <i>Saussurea controversa</i> DC.</p>	<p>Астровые <i>Asteraceae</i></p>	<p>Листья</p>	<p>Водный настой и настойка на 40% этаноле</p>	<p>ВРПС, ПВ, лигнаны (сирингин), флавоноиды, биоэлементы</p>	<p>Иммунотропное</p>	<p>[80, 83, 86]</p>

Исходя из данных, представленных в таблице 1, в качестве средств народной медицины при лечении ОМ используются растения, содержащие БАВ следующих групп: полисахариды, биоэлементы, флавоноиды, фенилпропаноиды, иридоиды, карбоновые кислоты, каротиноиды. Следует отметить, что практически для всех используемых видов растительного сырья характерно наличие иммуномодулирующей, противовоспалительной и анаболической активности. Таким образом, скрининг видов, перспективных для терапии ОМ целесообразен с учетом содержащихся в растениях комбинаций вышеуказанных групп БАВ.

В настоящее время проводятся интенсивные научные исследования по влиянию природных соединений при патологии костной ткани. Одним из наиболее перспективных направлений исследований является активация процессов костной репарации. Известны работы зарубежных исследователей о влиянии флавоноидов и изофлавоноидов на течение ОМ путем активации остеобластов и ингибирования активности остеокластов [92,124]. Имеются сведения о действии крахмальных полисахаридов на увеличение скорости пролиферации, дифференцировки и созревания остеобластов посредством индукции костного морфогенетического белка второго типа, что приводит к восстановлению костной ткани [105]. Зарубежными учеными показано, что растительные некрахмальные полисахариды ингибируют остеопороз и уменьшают остеокластогенез посредством увеличения в ядрах клеток количества белка  $\beta$ -катенина и снижения экспрессии генов, связанных с остеокластами [168]. Установлено положительное влияние фенолокислот (хлорогеновой, кофейной, коричной и феруловой) на остеобласты и процессы воспаления [107,117,121,169,170]. Кроме того выявлено, что дубильные вещества, такие как эпигаллокатехин-3-галлат, оказывают аналогичное воздействие, а в комбинации с хлорогеновой кислотой, значительно усиливают положительное влияние на процессы костной репарации [135,162].

Для дополнительной оценки степени воздействия на патогенетические звенья ОМ, проведен анализ современных данных научной медицины. При этом имеющиеся сведения показывают, что растительные полисахариды оказывают значительное влияние на фазу воспаления и иммунитет, и практически не влияют на минеральный обмен [34,35,77,104,146,150,159]. Кроме того, биоэлементы (Ca, Mg, P, B, V, Zn, Cu и др.) оказывают влияние на минеральный обмен, в частности на микроархитектуру костной ткани [98,101,112,118,161]. Фенольным соединениям (флавоноидам и фенолокислотам) присуща противовоспалительная и мембраностабилизирующая активность, что также является важным фактором при лечении ОМ [47,88,91,103,116,132,139,156,166].

Соответственно, согласно данным литературы, растения перспективные для лечения ОМ, должны накапливать полисахариды, флавоноиды, биоэлементы и карбоновые кислоты в мажорных количествах.

Предпосылками к данной работе явились скрининговые исследования, в результате которых было установлено, что экстракт из листьев соссюреи спорной (*Saussurea controversa* DC.) на 40 % этаноле эффективен при экспериментальном остеомиелите [1]. Действие нативного экстракта приводит к изменению отдельных показателей иммунной системы. В частности имеет место стимуляция гуморальной ветви иммунитета на 7 сутки, после иммунизации мышей эритроцитами барана [133]. Несмотря на перспективность использования соссюреи спорной, ее химический состав малоизучен. Таким образом, на основании результатов экспериментальных исследований, наиболее перспективным кандидатом для комплексной терапии ОМ считаем *S. controversa* DC.

## **1.2. Характеристика *S. controversa* DC. в общей картине рода *Saussurea***

Соссюрея - *Saussurea* DC. (сем. Asteraceae) – род многолетних травянистых растений, который включает более 350 различных видов, произрастающих в Евразии и Латинской Америке. Главный центр

видообразования находится в Центральной Азии на территории Гималайской горной системы [46]. Химический состав и биологическая активность растений рода *Saussurea* активно изучается зарубежными исследователями. Так, в Китае хорошо исследован химический состав сосюреи обернутой (*S. involucrata* Kar. et Kir.), включенной в Китайскую фармакопею. В ней обнаружены такие группы БАВ как фенилпропаноиды (сирингин, 3-кафеоилхинная кислота, тангшенозид III и др.); флавоноиды (гиспидулин, яцеозидин, лютеолин, непетин, гликозиды кверцетина, хризозериола, апигенина и кемпферола); лигнаны (ацилгликозиды арктигенина, арктиин); сесквитерпеновые лактоны (япониколактон, инволюкратин, эвдесманолит и др.); стероиды (буфоталин, даукостерол,  $\beta$ -ситостерол и др.). Выделены две полисахаридные фракции CSIP 1-2 и CSIP 2-3 с молекулярными массами 163,5 и 88,6 кДа соответственно. Установлена противоопухолевая, противоревматическая, антиоксидантная и иммуномодулирующая активности травы с. обернутой [102]. Индийскими учеными исследован химический состав *S. costus* Falc. (син. *S. lappa* C.V. Clarke), установлено наличие сесквитерпеновых лактонов (костунолит, алантолактон, изоалантолактон, залузанин, цинаропикрин, рейнозин, сантамарин); стероидных соединений ( $\beta$ -ситостерол, 22-дигидростигмастерол, прегненолон); жирных кислот (пальмитиновая, линолевая кислоты); аддуктов аминокислот и сесквитерпеновых лактонов (соссюреамины А, В, С, D, E); гликозидов лигнанов (1-гидроксипинорезинол-1- $\beta$ -D-глюкопиранозид, (-)-массонирезинол 4''-O- $\beta$ -D-глюкопиранозид); эфирного масла (содержание 1,39%). В экспериментах показана противовоспалительная, гепатопротекторная, противоопухолевая и иммуномодулирующая, гипогликемическая, гиполипидемическая, антимикробная и противопаразитарная активность *S. costus* [144]. Зарубежными учеными из нескольких видов сосюрей впервые были выделены новые вещества. Так, из *S. petrovii* Lipsch. выделены тритерпеновые соединения (таракаст-20-ен-

3 $\beta$ ,22 $\alpha$ -диол и 20 $\alpha$ ,21 $\alpha$ -эпокси-тараксастан-3 $\beta$ ,22 $\alpha$ -диол) и сесквитерпеновые лактоны (петровины А и В). Из *S. stella* Maxim. выделены сердечные гликозиды: 3-О- $\beta$ -D-квиновопиранозилпериплогенин и 3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозил-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -L-рамнопиранозилканногенин). Из *S. medusa* Maxim. выделены 2 соединения производных фенола: 2 $\alpha$ -гвайацил-4-оксо-6 $\alpha$ -катехил-3,7-диоксобицикло[3.3.0]октан и 1 $\alpha$ -гидрокси-2 $\alpha$ ,4 $\alpha$ -гвайацил-3,7-диоксобицикло[3.3.0]октан. Из *S. cauloptera* Hand.-Mazz. изолированы сесквитерпеновые лактоны: 7 $\alpha$ -гидроксигерин и 8-О-деацетилгерин. Вышеперечисленные виды за счет наличия сесквитерпеновых лактонов и тритерпеновых соединений обладают цитостатической активностью. Кроме того, выявлена противоопухолевая, противогрибковая и антибактериальная активность данных видов [130].

В Российской Федерации основными местами произрастания являются Урал, Сибирь и Дальний Восток. В частности, на территории Сибири, в лесостепной, лесной и горной зонах, встречаются 52 вида [60]. На территории России хорошо исследованы с. иволистная (*S. salicifolia* L.) и с. горькая (*S. amara* L.). В траве с. иволистной обнаружены кумарины (умбеллиферон, эскулетин, скополетин); фенолокислоты (кофейная кислота); флавоноиды (кверцетин, апигенин, гиперозид); углеводы (L-арабиноза, D-глюкоза, D-галактоза, D-ксилоза); сесквитерпеновые лактоны (янерин, репин, цебеллин G, цинаропикрин). Установлена противоописторхозная и противоямблиозная активность этанольных экстрактов травы с. иволистной [57]. В надземной части с. горькой при помощи хроматографических методов обнаружены фенолкарбоновые кислоты (кумаровая, коричная, изованилиновая, галловая кислоты); флавоноиды (рутин, кверцетин, лютеолин, мирицетин); кумарины (эскулин, эскулетин, хаплоперозид А, фраксетин, обтусинин); сесквитерпеновые лактоны (гроссгемин, репин, цинаропикрин). Исследован полисахаридный комплекс с. горькой, общее содержание полисахаридов – 13,34% [61]. Экспериментально установлена

противоописторхозная и гепатопротекторная активность этанольных экстрактов надземной части с. горькой [62]. Несмотря на перспективность данного рода большинство филогенетически близких видов мало исследованы. В частности, к ним относится с. спорная (*S. controversa* DC.), популярная в народной медицине в лечении ряда заболеваний [85, 86].

*Saussurea controversa* DC. (соссюрея спорная) – бореально-монтанный, урало-сибирский вид с дизъюктивным ареалом. После разрыва сибирская часть ареала охватывает юго-восток Западной Сибири, юг Восточной Сибири и север Монголии [54]. Вид обитает преимущественно в лесной области, на лугово-степных фитоценозах, щебнистых, каменистых склонах [63]. В Восточной Сибири часто произрастает на каменистых склонах, карбонатизированных и кальцифицированных почвах, на выходах известняка [21]. Растение имеет стебли высотой 25-100 см, кочковато-паутинисто опушенные, часто окрашенные в темный фиолетово-коричневый цвет. Листья длиной 5-12 см и шириной 2-9 см, на верхней стороне зеленые, снизу беловойлочные, по краю неравнозубчатые. Листья представлены тремя формациями - нижние длинночерешковые, яйцевидные или продолговато-яйцевидные, глубокосердцевидные при основании с острой верхушкой [38,63]. Листья средней формации – короткочерешковые, узкие, при основании тупые, не сердцевидные. Листы верхней формации – сидячие, мелкие, ланцетовидные. Корзинки собраны в небольшом числе в плотном щитке. Обертки черепитчатые, паутинисто-пушистые, наружные листочки их широкояйцевидные, коротко заостренные, внутренние - продолговатые, на верхушке тупые и густо-шерстистые. Все корзинки в верхней части черновато-фиолетовые [38]. Цветоложе густопленчатое. Цветки лилово - фиолетовые. Этот вид относится к многолетним травянистым растениям с полициклическими розеточными вегетативными и удлиненными генеративными побегами. В онтогенезе выделены 4 основных фазы: вегетация, бутонизация, цветение, плодоношение. Фаза цветения приходится

на июль, не является постоянной и происходит в среднем, раз в 3 года. Поэтому на ключевых участках преобладают бесстебельные формы растения и основная вегетативная масса представлена листьями (рисунок 3).

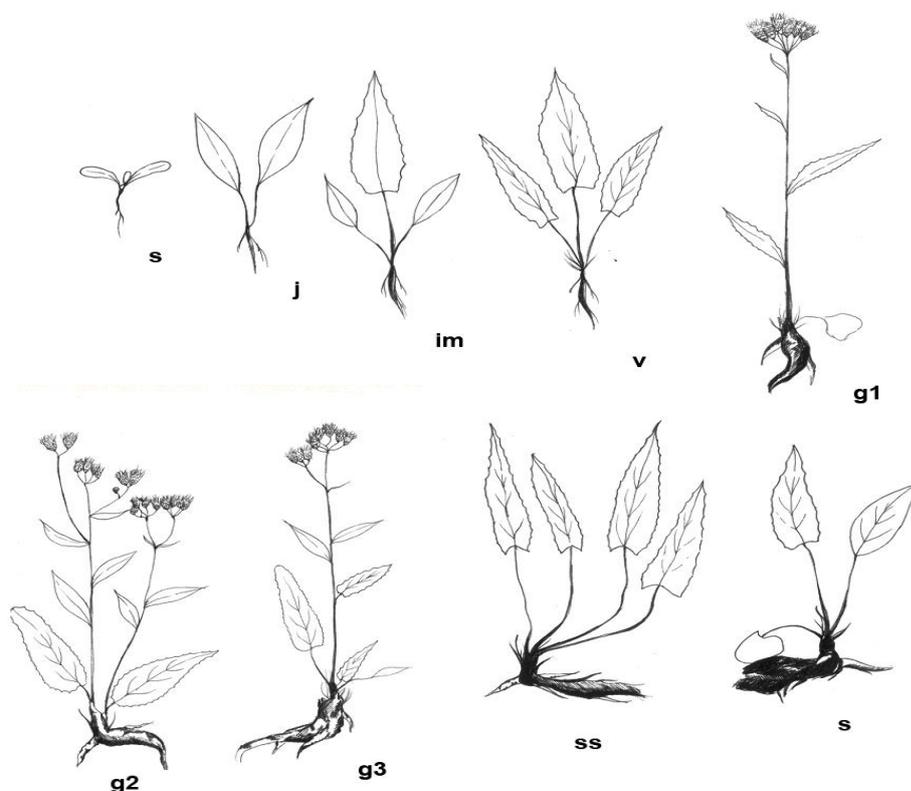


Рисунок 3 – Онтогенез сосюреи спорной (*Saussurea controversa* DC.): s–проросток, j–ювенильное, im–имматурное, v–виргинильное, g1–молодое генеративное, g2–средневозрастное, g3–старое генеративное, ss–субсенильное, s–сенильное.

*S. controversa* DC. относится к 3 категории ресурсных видов. Рекомендуемая периодичность заготовки - 1 раз в 3–4 года. При оценке ресурсных запасов в Хакасии определено, что с площади ключевого участка 2700 м<sup>2</sup> при плотности популяции 113,6 экз./ м<sup>2</sup> и доле виргинильных особей 45 % биологический запас сырья на ключевом участке составил 56 кг воздушно-сухого сырья [149]. Результаты многолетнего интродукционного эксперимента (Сибирский ботанический сад ТГУ) свидетельствуют о возможности успешного выращивания *S. controversa* в условиях юга Томской

области. Ресурсообеспеченность и возможность интродукции, делают данный вид перспективным для внедрения в ГФ Российской Федерации [77].



Рисунок 4 – Соссюрея спорная (*Saussurea controversa* DC.), в естественном месте произрастания и гербарный экземпляр.

Важно отметить, что из-за большого количества близких видов, сложности систематики и классификации, на территории Сибири и Забайкальского края некоторыми ботаниками вид описывается под названиями *Saussurea discolor* Willd. – соссюрея двухцветная и *S. propinqua* Pjij – соссюрея близкая. Однако в настоящее время под данными названиями следует понимать именно *Saussurea controversa* DC. - соссюрея спорная. *S. controversa* DC. также известна под названиями горькуша спорная, братский трут, односторонка.

В народной медицине используются листья *S. controversa* DC., которые применяются в виде отвара при глаукоме, остеомиелите, лёгочных заболеваниях, при туберкулезе легких и костей [20,85], как кровоостанавливающее, противоревматическое средство и при желудочно-кишечных заболеваниях [78,86]. *S. controversa* DC. издавна применяется в народной медицине Сибири, Бурятии, Монголии при эпилепсии, диарее, инфекционных заболеваниях, болезнях гепато-билиарной системы [20]. На Алтае водный настой корней принимали при головной боли и скрофулезе, употребляли в качестве кровоостанавливающего средства при маточных

кровотечениях [78]. Свежие листья обладают ранозаживляющим действием, особенно при гнойных ранах [80]. На модели экспериментального травматического остеомиелита *in vivo* установлена эффективность водного и водно-этанольного экстрактов *S. controversa* в сочетании с антибиотикотерапией [3].

В традиционной медицине Тибета и Китая успешно применяют близкие виды - “Tianshan Snow Lotus” (Тянь-шанский снежный лотос), что является общим названием для *S. lappa* (Decne.) Clarke., *S. costus* (Falc.) Lipsch. и *S. involucrata* (Kar. et Kir.) Sch. Bip. [154]. Вид *S. lappa* включен в фармакопею Китая. На его основе получают препарат для лечения ревматоидного артрита, стандартизированный по хлорогеновой кислоте и гликозидам кверцетина [102].

Экспериментально установлены противоопухолевая, антибактериальная, противопаразитарная, антиоксидантная, иммуностимулирующая виды активностей различных видов сосюрей [130, 144]. Аналогичную активность можно предполагать и у других видов *Saussurea* DC., благодаря способности представителей одного рода накапливать близкие по структуре БАВ.

Среди первичных метаболитов сосюрей, обладающих фармакологической активностью, следует отметить полисахаридный комплекс, проявляющий в эксперименте антиоксидантное и противовоспалительное действие [138,157]. Вторичные метаболиты сосюрей представлены преимущественно фенольными и терпеновыми соединениями. В растениях присутствуют моно- и дигликозиды флавоноидов, при этом, в качестве мажорных агликонов для большинства видов выступают: кверцетин, апигенин, лютеолин и кемпферол [153,165]. Отечественными исследователями установлены различия в качественном составе и содержании флавоноидов в двадцати видах *Saussurea*, произрастающих на территории Сибири. Содержание флавоноидов в листьях

разных видов находится в диапазоне 1,5-2,5 % и зависит от места произрастания [20]. Органические кислоты представлены фенолокислотами: оксибензойной, сиринговой; гидроксикоричными кислотами: хлорогеновой, коричной, сиринговой, а также кофейной кислотой и ее сложными эфирами [153]. Среди кумаринов выявлены умбеллиферон, эскулетин, остол, скополетин, скополин, скиммин. Из видов *Saussurea* выделены лигнаны производные тетрагидрофуранового ряда: (сирингарезинол, массаирезинол, арктигенин, ларицирезинол, фенилпропаноид сирингин) и сесквитерпеновые лактоны: (янерин, цинаропикрин, гроссгемин и др.) [127,128]. Среди метаболитов некоторых видов встречаются сесквитерпеновые лактоны, конъюгированные с аминокислотами пролином, аланином и цистеином, [105,123]. Изолированы тритерпеновые соединения, производные урсоловой и олеаноловой кислот:  $\alpha$ -амирин, олеаноловая кислота, тараксастерол, тритерпеновый спирт соссюрол, лупеол [59,154].

В траве *S. controversa* DC. обнаружены водорастворимые нейтральные и пектиновые полисахариды, аскорбиновая и кофейная кислоты, флавоноиды, тритерпеновые сапонины [17,80,133]. Листья растения также содержат ряд биологически активных веществ: флавонолгликозиды - преимущественно производные кверцетина и мирицетина [7,60]; гидроксикоричные кислоты - хлорогеновую, коричную, сиринговую; фенилпропаноиды - сирингин, сирингорезинол; биогенные элементы: Ca, K, Mg, P [17,81]. Из метанольного экстракта надземной части (без цветоносов) *S. controversa* были выделены н-алканы C<sub>23</sub>-C<sub>31</sub>,  $\beta$ -ситостерин, стигмастерин, кампестерин, кверцетин, рутин [84]. Химический состав *S. controversa* DC. представлен в таблице 2.

Таблица 2 – Химический состав *S. controversa* DC. по данным литературы

№ п/п	Класс биологически активных соединений	Представители	Источник литературы
1	Кумарины	эскулетин	[60]
2	Терпеноиды	5(R)-(b-D- глюкопиранозилокси)-2- [3(R)-гидроксибутил]-1,3,3- триметилциклогексен 5(R)-гидрокси-(b-D- глюкопиранозилоксибутил) 1,3,3-триметилциклогексен	[82]
3	Фитостерины	$\beta$ -ситостерин, кампестерин, стигмастерин $\beta$ -ситостерин – $\beta$ -D- глюкопиранозид	[82]
4	Тритерпеновые соединения	Олеаноловая кислота	[80]
5	Флавоноиды	Лютеолин, апигенин, рутин, кверцетин, кемпферол, гиперозид, кверцетин-3,5- глюкоарабинозид, мирицетин-3-глюкозид, мирицетин-3-рамнозид	[60]
6	Фенилпропаноиды	Сирингин	[82]
7	Органические кислоты	Галловая, коричная, кофейная.	[17,60]
8	Полисахариды	Водорастворимые и кислые полисахариды, пектиновые вещества.	[2]
9	Биогенные элементы	Ca, Si, Br, Fe, Na, Au, Ag, Sm, Ce, Lu, Yb, Hf, Nd, Cs, Tb, Sc, Rb, Ta, Eu, La.	[8]
10	Свободные углеводы	D-ксилоза	[80]

Итоги обзора доступных источников научной литературы свидетельствуют об актуальности фармакогностического и фармакологического исследования *S. controversa* DC. Учитывая значительный ресурсный потенциал *S. controversa* DC. [149], возможности интродукции [77], популярность в народной медицине [85,86], а также результаты экспериментальных исследований остеогенной и иммуностропной активностей [1,3,59], данный растительный объект можно считать перспективным кандидатом для комплексного фармацевтического исследования. А изучение химического состава, фармакологических свойств БАВ с последующей разработкой нормативной документации на лекарственное растительное сырье для комплексной терапии остеомиелита является актуальной задачей нашего исследования.

### **Выводы к главе 1**

1. Комплексная терапия остеомиелита должна сочетать остеогенные, иммуномодулирующие и противовоспалительные эффекты, действующие на ключевые звенья патогенеза.
2. Основными группами БАВ растений, проявляющими остеогенные иммуномодулирующие и противовоспалительные эффекты при остеомиелите являются полисахариды, флавоноиды, биогенные элементы (Ca, Mg, B, P) и карбоновые кислоты.
3. Соссюрея спорная является перспективным объектом для исследования фармакологического воздействия на ключевые патогенетические звенья остеомиелита, выявления целевых групп БАВ, ответственных за биологическую активность, их стандартизации для разработки и внедрения НД в фармацевтическую практику.

## ГЛАВА 2. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1. Объекты исследования

В качестве объекта исследования использовали надземную часть сосюреи спорной *S. controversa* DC. – листья с черешками (рисунок 5).



Рисунок 5 – Цельное и измельченное сырье – листья *S. controversa* DC.

Листья (розеточные и стеблевые) и стебли заготавливали в Иркутской области, Красноярском крае, Республике Хакасия (таблица 3) и высушивали воздушно-теневым способом при температуре 20-25 °С до содержания влаги 5-9%.

Таблица 3 – Места и годы заготовки листьев *S. controversa* DC.

№ п/п	Место заготовки	Год заготовки	Сроки заготовки	Фаза развития растения
1.	Иркутская область, окр. пос. Нижний Кочергат	2014	15-18 июля	Цветение
2.	Красноярский край, окр. оз. Инголь;	2016	20-22 июля	Цветение
3.	Хакасия, окр. с. Мендоль;	2016	23-24 июля	Цветение

4.	Хакасия, окр. с. Ефремкино;	2016	25-26 июля	Цветение
5.	Хакасия, окр. с. Мендоль;	2017	15-16 июля	Цветение
6.	Хакасия, окр. с. Ефремкино;	2017	18-19 июля	Цветение
7.	Хакасия, окр. с. Карлыбас;	2017	20-21 июля	Цветение

## 2.2. Стандартные образцы, реактивы и растворители

Для выполнения экспериментальных исследований использовали стандартные образцы, реактивы и растворители – таблица 4.

Таблица 4 – Стандартные образцы, реактивы и растворители, использованные в работе

Стандартные образцы		
Наименование	Степень чистоты	Производитель
Апигенин	95,0	Sigma-Aldrich
L-(+)-Арабиноза	98,0	Sigma-Aldrich
L-Аргинин	98,0	Sigma-Aldrich
L-Валин	98,0	Sigma-Aldrich
D-(+)-Галактоза	99,0	Millipore
Галловая кислота	98,0	Supelco
Глицин	99,0	Sigma-Aldrich
D-(+)-Глюкоза	96,0	Sigma-Aldrich
Дигидрокверцетин	90,0	Sigma-Aldrich
Кверцетин	95,0	Sigma-Aldrich
Кемпферол	90,0	Sigma-Aldrich
Коричная кислота	97,0	Supelco
Кофейная кислота	99,0	Supelco
D-(+)-Ксилоза	99,0	Sigma-Aldrich
L-Лизин	98,0	Sigma-Aldrich
Миоинозитол	99,0	Millipore
L-(+)-Рамноза	99,0	Millipore
Рутин	97,0	Sigma-Aldrich

Салициловая кислота	99,0	Supelco
L-Треонин	98,0	Sigma-Aldrich
Умбеллиферон	99,0	Supelco
D-(-)-Хинная кислота	99,0	Supelco
Хлорогеновая кислота	95,0	Sigma-Aldrich
Эскулетин	99,0	Supelco
<b>Реактивы</b>		
<b>Наименование</b>	<b>Степень чистоты</b>	<b>Производитель</b>
Алюминия хлорид	99,0	ЛенРеактив
Борная кислота	хч	ЛенРеактив
Железоаммонийные квасцы	чда	ЛенРеактив
Лимонная кислота	хч	ЛенРеактив
Натрия боргидрид	99,0	Sigma-Aldrich
Натрия гидроксид	98,0	ЛенРеактив
Натрия хлорид	98,0	ЛенРеактив
Свинца ацетат	чда	ЛенРеактив
Формальдегид	37,0	ЛенРеактив
Фосфорномолибденовая кислота	хч	ЛенРеактив
<b>Растворители</b>		
<b>Наименование</b>	<b>Степень чистоты</b>	<b>Производитель</b>
Ацетон	хч	ЛенРеактив
Ацетонитрил	for HPLC	Sigma-Aldrich
Гексан	осч	ЛенРеактив
Изоамиловый спирт	чда	ЛенРеактив
Метанол	хч	ЛенРеактив
Н-бутанол	хч	ЛенРеактив
Н-октанол	for HPLC	Sigma-Aldrich
Пиридин	чда	ЛенРеактив
Серная кислота	хч	ЛенРеактив
Толуол	осч	ЛенРеактив
Трифторуксусная кислота	for HPLC	Sigma-Aldrich
Трихлорметан	хч	ЛенРеактив
Уксусная кислота	хч	ЛенРеактив

Уксусный ангидрид	for GC	Supelco
Хлороводородная кислота	хч	ЛенРеактив
Этанол	95,0	Essentica
Этилацетат	хч	ЛенРеактив

### 2.3. Методы общего фитохимического анализа на группы БАВ в листьях *S. controversa* DC.

Для целей фитохимического анализа на группы БАВ из подготовленного сырья (высушенного и измельченного до размера частиц 2-3 мм) получали водные, водно-спиртовые извлечения на 40% этаноле при нагревании на водяной бане с обратным холодильником.

Для хроматографического анализа и изолирования индивидуальных веществ из 40% этанольного экстракта, сконцентрированного под вакуумом до водного остатка методом жидкость-жидкостной экстракции были получены хлороформные, этилацетатные, бутанольные и водные фракции.

Обнаружение сесквитерпеновых лактонов осуществляли по методу К.С. Рыбалко [73]. Для этого 30,0 г измельченного сырья настаивали с горячей водой в соотношении 1:5, (80 °С, 1 ч), и фильтровали. Полученное водное извлечение трижды экстрагировали хлороформом в соотношении 1:1. Хлороформную фазу отделяли, объединяли, обезвоживали, пропуская через безводный  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , и удаляли растворитель под вакуумом. Далее в хлороформной пленке снимали ИК-спектр полученного остатка.

Обнаружение сапонинов в водном извлечении проводили с помощью качественных реакций (проба на пенообразование, проба Фонтан – Кандела, реакцию с раствором  $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ) [39,42].

Обнаружение дубильных веществ в водном извлечении проводили с помощью следующих качественных реакций: с 1%-м раствором желатина в 10%-м растворе  $\text{NaCl}$ ; по Стиасни (40% раствор формальдегида и конц.  $\text{HCl}$ ); с 1% раствором ЖАК [48].

Для определения кумаринов проводили качественные реакции с 5% раствором NaOH, азосочетания, лактонную пробу в спиртовом извлечении (96% этанол, 1:10, 80-85 °С, 0,5 ч) [42].

Флавоноиды определяли в спиртовом извлечении с помощью общепринятых качественных реакций: проба Синода по Брианту (конц. HCl и магниевая стружка, октиловый спирт); с 5% раствором AlCl<sub>3</sub>; реакция Вильсона [36, 39]. Количественное определение флавоноидов проводили спектрофотометрическим методом в пересчете на рутин [4].

Обнаружение фенолкарбоновых кислот проводили с помощью БХ и ТСХ [148]. Количественное определение – спектрофотометрическим методом в пересчете на хлорогеновую кислоту [43].

Для обнаружения алкалоидов получали два извлечения: кислое – раствор А, и щелочное – раствор Б [30,49]. Раствор А готовили следующим образом: 10,0 г воздушно-сухих измельченных листьев *S. controversa* DC., помещали в колбу с притертой пробкой заливали водой подкисленной HCl до pH 2, в соотношении 1:10, колбу закрывали и оставляли на 12 ч для экстракции алкалоидов. Экстракт фильтровали, фильтрат подщелачивали раствором аммиака до pH 9, затем в делительной воронке проводили реэкстракцию алкалоидов в органическую фазу хлороформом и вновь экстрагировали алкалоиды подкисленной водой, получая при этом осветленный раствор, свободный от балластных веществ.

Для приготовления раствора Б 10,0 г измельченного сырья заливали водным раствором NH<sub>4</sub>OH (pH 10) и оставляли на 24 ч для экстракции. Экстракт фильтровали и извлекали хлороформом алкалоиды в виде оснований. Полученную вытяжку подкисляли хлористоводородной кислотой до pH 2, затем проводили реэкстракцию в щелочную среду вышеуказанным способом. С растворами А и Б проводили качественные реакции с общеалкалоидными реактивами (Бушарда, Драгендорфа, Зонненштейна, Несслера).

Для выделения эфирного масла применяли модифицированный метод Клевенджера [25]. Выбор данного метода обусловлен низким удельным содержанием эфирного масла в сырье (< 1%) и образованием эмульсии при перегонке. 150,0 г сырья измельченного до размера частиц 3-6 мм, помещали в термостойкую круглодонную колбу, установленную на нагревательную плиту, заливали водой очищенной в соотношении 1:5, присоединяли установку для гидродистилляции и в течение 6 ч проводили перегонку эфирного масла. Для концентрирования малого количества липофильной фазы в сосуд-приемник, вносили 0,2 мл гексана. Остатки воды удаляли путем выдерживания эфирного масла над свежeproкаленным  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Исследование качественного состава вели хромато-масс-спектрометрическим методом на приборе Agilent 5890N с квадрупольным масс-селективным детектором, Agilent 5973N EI/PCI. Разделение осуществляли на кварцевой капиллярной колонке HP- 5ms (30 м × 0.25 мм), неподвижная фаза – сополимер 5%-дифенил-95%-диметилсилоксан, толщина пленки неподвижной фазы – 0.25 мкм. Газ-носитель: гелий с постоянным потоком 1мл/мин. Температурный режим колонки: 50°C (2 мин), 50 – 240°C (4°C/мин), 240 – 280°C (20°C/мин), 280°C (5 мин). Обработку полученных данных выполняли с использованием программ Agilent Chemstation и AMDIS. Содержание компонентов вычисляли по площадям газохроматографических пиков без использования корректирующих коэффициентов. Идентификацию проводили путем сравнения индексов удерживания и полных масс-спектров с атласом спектров и масс-спектрометрической базой данных Wiley.

Для обнаружения полисахаридов 2,0 г воздушно-сухого сырья, помещали в коническую колбу и заливали водой очищенной в соотношении 1:10 и нагревали на водяной бане при 80 °C в течение 0,5 ч. Извлечение фильтровали, охлаждали до комнатной температуры. Полисахариды осаждали путем прибавления к 2 мл извлечения 8 мл 96% этанола. Так же проводили реакцию с антронсерным реактивом [37].

Для изучения элементного состава использовали воздушно-сухие листья, которые измельчали в агатовой ступке до размера частиц 0,5-1 мм и проводили отбор проб методом квартования. Пробоподготовку при анализе биоэлементов, осуществляли с использованием методик, разработанных для растительных объектов [67,68]. Для достижения наибольшей деструкции органической матрицы образцы подвергали разложению в микроволновой системе Speedwave TM MWS-3+ в присутствии азотной кислоты. Подготовленные пробы анализировали методом масс-спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой на приборе Agilent 7900 JP 14080159. В качестве контроля использовали метод добавок.

## **2.4. Методы исследования полисахаридов *S. controversa* DC.**

### **2.4.1. Выделение и очистка**

Известно, что растения содержат значительное количество хлорофилла, и других соединений, значительно затрудняющих выделение нативных полисахаридов, поэтому для повышения чистоты ПС проводили предварительную обработку сырья органическими растворителями: хлороформом и этилацетатом для удаления пигментов и этанолом для удаления фенольных соединений. Далее из подготовленного депигментированного сырья извлекали ПС ступенчатой экстракцией холодной, горячей водой при нагревании, и 0,7% раствором оксалата аммония при нагревании. Полученные фракции ПС подвергали депротеинизации по методу Севага [136]. Затем проводили диализ против воды очищенной. Суммы фракций лиофилизировали [45].

### **2.4.2. Определение молекулярно-массового распределения**

Молекулярно-массовые характеристики полученных ПС определяли методом высокоэффективной эксклюзионной хроматографии в сравнении с растворами стандартных образцов декстранов ( $c = 1$  мг/мл) с Mw 15, 40, 60, 90, 110, 250 и 500 кДа («Sigma-Aldrich», Германия) [145]. Коэффициент

гетерогенности ( $M_w/M_n$ ) рассчитывали как отношение средневесовой ( $M_w$ ) к среднечисленной ( $M_n$ ) молекулярной массе полисахаридов.

#### **2.4.3. Определение содержания белка**

Количественное определение белка проводили методом Лоури с предварительным осаждением (ОФС.1.2.3.0012.15 – метод 2 В), используя градуировочный график, построенный для растворов бычьего сывороточного альбумина [25].

#### **2.4.4. Определение уроновых кислот**

Содержание уроновых кислот (УК) определяли спектрофотометрическим методом, основанным на реакции продуктов окисления углеводов с 3,5-диметилфенолом в присутствии концентрированной серной кислоты, с использованием градуировочного графика, построенного для растворов галактуроновой кислоты. Измерение проводили при двух длинах волн 400 и 450 нм на спектрофотометре UNICO 2800 (США) [108].

#### **2.4.5. Получение ацетатов полиолов**

По 5 мг фракций ПС помещали в стеклянные ампулы, прибавляли по 3 мл трифторуксусной кислоты в концентрации 2 моль/л, содержащей в качестве внутреннего стандарта мио-инозитол в концентрации 1 мг/мл. Ампулы запаивали в пламени горелки и помещали в сушильный шкаф на 5 часов при температуре 100-105 °С. Полноту проведения гидролиза оценивали с помощью реактива Фелинга. Гидролизаты упаривали досуха в колбах на шлифах в присутствии метанола. Сухой остаток моноз растворяли в 1 моль/л растворе аммиака, прибавляли 5 мг боргидрида натрия, плотно закрывали стеклянными пробками и оставляли на 24 ч. Растворы упаривали досуха, прибавляли по 0,5 мл безводного пиридина и уксусного ангидрида. Затем реакционную смесь помещали в сушильный шкаф и проводили ацетилирование полиолов при  $t=100$  °С в течение 1 ч. Избыток уксусного ангидрида и пиридина удаляли упариванием под вакуумом в присутствии толуола [32].

#### **2.4.6. Определение мономерного состава**

Идентификацию ацетатов полиолов соответствующих моносахаридов проводили на хроматографе Varian 450-GC (Varian, США), оборудованном пламенно-ионизационным детектором с использованием капиллярной колонки VF-5 MS (Varian, США; 0,25 мм, 30 м), анализ проводили в температурном режиме от 175°C (1 мин) до 250°C (2 мин) со скоростью увеличения температуры 3°C/мин [71].

#### **2.5. Получение и фракционирование экстракта на 40% этаноле**

##### **2.5.1. Хроматографический анализ экстракта и его фракций**

Для получения экстракта измельченное сырье экстрагировали 40% водным этанолом (1:15) на водяной бане (80 °C) трижды. Порции объединяли и упаривали под вакуумом до водного остатка. Разделение суммарного экстракта на фракции проводили методом жидкость-жидкостной экстракции последовательно хлороформом, этилацетатом и н-бутанолом.

Часть полученных фракций, а также водный остаток гидролизовали 5% серной кислотой на кипящей водяной бане в течение 2 ч. Гидролизаты нейтрализовали до рН 7 бария гидроксидом, агликоны реэкстрагировали хлороформом и этилацетатом, а свободные углеводы определяли в водных фазах. Полученный экстракт, фракции, извлеченные органическими растворителями, водный остаток и их гидролизаты анализировали методом БХ на бумаге марок FN-4 и FN-12 (Германия), «Ленинградская», а также при помощи хроматографии в тонком слое сорбента на пластинах «Силуфол УФ-254» (Чехия) и «Сорбфил-ПТСХ АФ-УФ» в сравнении со стандартными образцами веществ-свидетелей. Хроматографические системы и способы детектирования представлены в таблице 5 [24,36,93,154].

Таблица 5 – Хроматографические системы и способы детектирования при проведении БХ и ТСХ

Группа БАВ	Анализируемая фракция	Хроматографические системы		Детекция	
		БХ	ТСХ	БХ	ТСХ
Кумарины	ХЛФ, ЭА	H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (40:60)	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :EtOAc (70:30) C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> : C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O (50:50); C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> : C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (33:65:2)	УФ свет 254/365 нм	УФ свет 254/365 нм 5%-й спиртовый р-р КОН, диазотированная сульфани- ловая кислота, I <sub>2</sub> -пары
Флавоноиды	ХЛФ, ЭА, БФ, ВО	H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (85:15; 70:30; 40:60;)	н-BuOH: CH <sub>3</sub> COOH : H <sub>2</sub> O (40:10:50)	УФ-свет 254/365 нм, NH <sub>3</sub> пары, 3% спиртовый раствор AlCl <sub>3</sub>	УФ-свет 254/365 NH <sub>3</sub> пары, 5% спиртовый раствор AlCl <sub>3</sub> , реактив Вильсона
Фенолкарбоновые кислоты	ХЛФ, ЭА, БФ, ВО	H <sub>2</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (95:5; 85:15; 70:30;)	EtOAc:H <sub>2</sub> O: HCOOH (65:20:15)	УФ-свет 254/365, NH <sub>3</sub> пары, 3% раствор FeCl <sub>3</sub> в MeOH	УФ-свет 254/365, I <sub>2</sub> -пары. Диазотированная сульфаниловая кислота, 20% раствор Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> , видимый свет
Сапонины	БФ, ВО	-	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> : C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O: CH <sub>3</sub> COOH (19:80:1); CHCl <sub>3</sub> :C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O (70:30); CHCl <sub>3</sub> :MeOH: CH <sub>3</sub> COOH (94:5,5:0,5)	-	25% спиртовый раствор фосфорно-вольфрамовой кислоты I <sub>2</sub> -пары
Моносахариды	ЭА, БФ, ВО	н-BuOH:C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N: H <sub>2</sub> O (6:4:3)	EtOAc:HCOOH: CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O (60:15:15:10)	Раствор анилин фталата в н-бутаноле, t = 105 °С	0,5% раствор тимола в H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> конц., t = 105 °С
Аминокислоты	ВО	н-BuOH: CH <sub>3</sub> COOH : H <sub>2</sub> O(60:15:25)	н-BuOH:C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N : H <sub>2</sub> O(6:4:3)	0,2% р-р нингидрина в ацетоне	0,3% р-р нингидрина в н-BuOH содержащий CH <sub>3</sub> COOH

Для ВЭЖХ экстракта и его фракций по 2 мг исследуемых образцов растворяли в 0,5 мл 80% этанола, раствор отфильтровывали, отбирали 5 мкл и вносили в устройство для ввода пробы хроматографа (Shimadzu LC-20AD, Япония) с колонкой PerfectSil Target ODS-3 (MZ-Analysentechnik GmbH, Германия). Элюирование осуществляли смесью ацетонитрила, изопропанола – объемное соотношение 5:2, и 0,1% раствора трифторуксусной кислоты с увеличением градиента от 15% к 35% с временным интервалом от 0 до 40 минут, скорость элюирования – 1 мл/мин [5].

Количественное определение веществ методом ВЭЖХ осуществляли на жидкостном хроматографе Ultimate 3000 (Thermo, США) оснащенном ультрафиолетовым детектором

### **2.5.2. Выделение и установление структуры индивидуальных соединений**

Различные фракции, полученные из водно-спиртового экстракта подвергали разделению на индивидуальные компоненты методом колоночной хроматографии на силикагеле (Lachema, Чехия) и полиамиде (Woelm, Германия), в качестве элюентов использовали системы хлороформ-метанол и этанол-вода в различных соотношениях [94, 95].

Температуру плавления индивидуальных веществ определяли на приборе Stuart SMF-38 (Bibby scientific, Великобритания). УФ спектры снимали в этанольных растворах с концентрацией веществ  $10^{-4}$  моль/л на спектрометре HP 8453 UV-Vis spectrometer (Hewlett-Packard, Германия). Инфракрасные спектры снимали в таблетках с калия бромидом на приборе Nicolet 5700 (FT-IR, Thermo Fisher Scientific, США) Элементный CHN анализ проводили на анализаторе CarloErba 1106 (CarloErba, Италия). ЯМР-спектры снимали в дейтерированном метаноле и диметилсульфоксиде на ЯМР спектрометре BrukerAV - 600 с рабочими частотами: 600.30 ( $^1\text{H}$ ) и 150,95 МГц ( $^{13}\text{C}$ ) (Bruker BioSpin GmbH, Германия). ГХ/МС спектры получали на масс-спектрометре Thermo Scientific DFS (Thermo Fisher Scientific, США) при

температуре паров 200–220 °С, с электронной ионизацией в 70 эВ. Наличие неорганических компонентов устанавливали на масс-спектрометре с индуктивно-связанной плазмой Agilent 7900 JP 14,080,159 (Agilent Technologies, Япония) разрушение органической матрицы проводили в микроволновой системе Speedwave MWS TM-3+ в присутствии азотной кислоты [94,95].

## **2.6. Методы морфолого-анатомического исследования**

Для выполнения анатомического исследования, использовали воздушно-сухие листья *S. controversa*, собранные в ареалах естественного произрастания. Ввиду особенностей гистологического строения - наличия большого количества кроющих волосков, разваривание сырья проводили в более мягких условиях. Листья помещали в термостойкий стакан с дистиллированной водой и подвергали микроволновому излучению при температуре кипения в течение 0,5-1 мин. Препараты из листьев и черешков изготавливали с помощью микротомы. Изучали строение верхнего и нижнего эпидермиса, тип устьичного аппарата, кроющих волосков. Устьичный индекс - количество устьиц на единицу площади листа, размер устьиц и клеток эпидермиса исследовали с помощью микроскопа «Axio Lab A1» (Carl Zeiss, Германия) при помощи программного обеспечения «Zen Lite 2011» [13,148].

## **2.7. Определение показателей качества растительного сырья**

Основные показатели качества: измельченность, потерю в массе при высушивании, общую золу, содержание примесей в растительном сырье определяли в соответствии с ОФС 1.5.1.0001.15 - Лекарственное растительное сырье и ОФС 1.5.3.0004.15 - Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах [25].

## **2.8. Методы биологических исследований**

При проведении биологических экспериментов руководствовались принципами, изложенными в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинской декларации. Исследования одобрены локальным этическим комитетом ФГБОУ ВО СибГМУ (заключение № 5539 от 02.10.2017).

### **2.8.1. Исследование острой токсичности**

Острую токсичность сухого экстракта определяли в соответствии с руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств [53]. Эксперименты выполняли на белых крысах обоего пола линии Wistar массой 280-300 г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и корму. Острую токсичность оценивали по нервно-соматическим показателям, данным анализов крови, весовым коэффициентам и макроскопическому исследованию внутренних органов. Весовые коэффициенты внутренних органов, рассчитывали как отношение массы органа к общей массе животного [53]. Период наблюдения составил 14 суток. Анализ крови осуществляли на автоматическом гематологическом анализаторе для ветеринарии PCE 90 Vet (США, High Technology). При оценке токсичности руководствовались классификацией Ходжа и Стернера, а также ГОСТом (12.1.007-76).

### **2.8.2. Исследование иммуотропной активности**

Иммуотропную активность соединений определяли с помощью теста на продукцию оксида азота макрофагами. В экспериментах использовали 45 мышей-самцов линии C57BL/6 конвенциональной категории в возрасте 8-10 недель, полученных из отдела экспериментальных биологических моделей НИИФирМ им. Е.Д. Гольдберга. Все процедуры с животными проводили в соответствии с ГОСТ 33215-2014 «Правила оборудования помещений и организация процедур при работе с лабораторными животными» и Директивой 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета ЕС по охране

животных, используемых в научных целях. Этическая экспертиза проведена комиссией по биоэтике НИИФиРМ им. Е.Д. Гольдберга ТНИМЦ, протокол экспериментов на животных соответствовал этическим нормам и принципам биомедицинских исследований (протокол № 98122015). Мышей умерщвляли цервикальной дислокацией, в брюшную полость заливали ледяной изотонический раствор хлорида натрия 0,9 % (ФР, ООО «Завод Медсинтез»), выделяли суспензию клеток, которую культивировали 2 ч в пластиковых чашках Петри ( $2-2,5 \times 10^6$  клеток/мл) в полной культуральной среде (RPMI 1640 («Sigma», США), 10% ЭТС («HyClone», Великобритания), 20 мМ HEPES («Sigma», США), 0,05 мМ 2-меркаптоэтанола («Sigma», США), 50 мкг/мл гентамицина («Sigma», США), 2 мМ L-глутамина («Sigma», США)) в атмосфере 100% влажности и 5% CO<sub>2</sub>. Затем собирали прилипшие к пластику макрофаги, которые культивировали ( $3,0 \times 10^6$  клеток/мл) в плоскодонных 96-луночных планшетах в присутствии исследуемых веществ, 0,1 мкг/мл липополисахарида (ЛПС, серотип O111:B4, «Sigma», США) или 30 мкг/мл мурамилдипептида (МДП, N-ацетилмурамил-L-аланил-D-изоглутамин, «Calbiochem», США) в качестве референтного вещества. Через 48 ч отделяли супернатанты клеток, смешивали их с эквивалентным объёмом реактива Грейса и измеряли экстинкцию раствора на автоматическом анализаторе ChemWell®Combo (Awareness Technology, Inc., США) при длине волны 545 нм [121]. Концентрацию нитритов определяли по калибровочному графику, построенному с использованием стандартных растворов нитрита натрия и выражали в мкМ. Для оценки пролиферации клеток колориметрическим методом [141] за 4 ч до окончания культивирования в лунки вносили раствор МТТ (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолиум бромид) («Sigma»), в конечной концентрации 200 мкг/мл. Надосадочную жидкость удаляли, осадок растворяли диметилсульфоксидом («Sigma»), оптическую плотность полученных растворов замеряли на автоматическом анализаторе при длине волны 545 нм [70,119].

### **2.8.3. Исследование остеогенной активности**

Исследование остеогенной активности мажорных групп БАВ проводили на мультипотентных мезенхимальных стромальных клетках (ММСК) культивируемых в лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий Инновационного парка Балтийского федерального университета им. И. Канта. Для этого формировали 4 группы клеток: 1) интактные; 2) с добавлением суммы полисахаридов; 3) с добавлением суммы флавоноидов; 4) с добавлением кислоты хелидоновой. Вещества прибавляли в культивируемую среду в концентрациях 10, 30 и 50 мг/л. Для подтверждения морфофункциональной природы ММСК клетки культивировали в 1,5 мл среды с реагентом из набора для дифференцировки StemPro (Thermo Fisher Scientific). Клетки окрашивали с использованием набора для фенотипирования и жизнеспособных фиксируемых красителей. Степень дифференцировки МСКК в остеобласты оценивали по площади клеток окрашиваемой 2% раствором ализаринового красного при помощи микроскопа Zeiss Axio Observer A1 microscope (Carl Zeiss Microscopy, США) и программного обеспечения ZEN 2012 software [95].

### **2.9. Статистическая обработка результатов**

Статистическую обработку результатов проводили в соответствии с ОФС1.1.0013.15 (Государственная фармакопея 14 издания) [25]. Для расчета использовали программы Statistica 6.0, Microsoft Office Excel, критерии Стьюдента, Манна-Уитни. При проявлении эффекта с уровнем значимости  $p < 0,05$  результаты эксперимента считали достоверными.

## ГЛАВА 3. ИССЛЕДОВАНИЕ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ЛИСТЬЕВ *S. CONTROVERSA* DC.

### 3.1. Общий фитохимический анализ на основные группы БАВ

#### Сесквитерпеновые лактоны

В ИК спектре хлороформного извлечения листьев *S. controversa* обнаружена полоса поглощения  $1739\text{ см}^{-1}$ , характерная для лактонного карбонила (рисунок б), что свидетельствует о присутствии в сырье сесквитерпеновых лактонов.

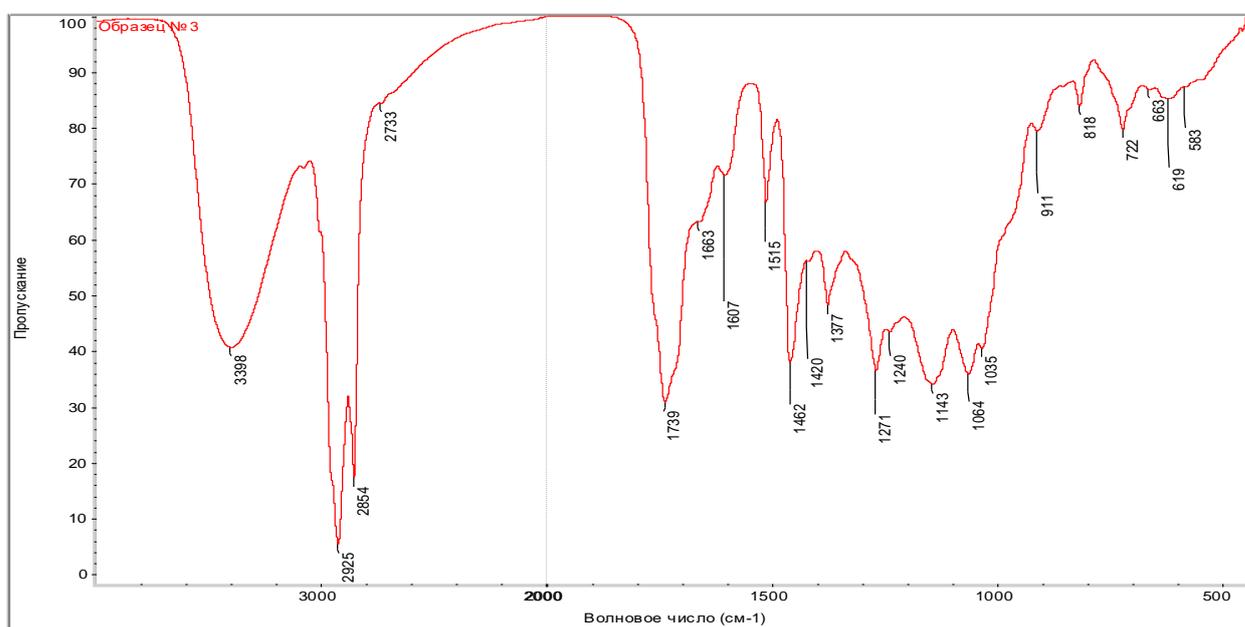


Рисунок б – ИК-спектр хлороформного извлечения листьев *S. controversa* DC.

#### Сапонины

При проведении пробы на пенообразование наблюдали образование устойчивой пены в течение 15 мин. В пробе Фонтан-Канделла наблюдали устойчивую пену одинаковую по высоте, как в кислой, так и в щелочной среде. При добавлении раствора свинца ацетата выпадал осадок кремового цвета. Таким образом, в сырье *S. controversa* содержатся сапонины тритерпенового ряда.

#### Дубильные вещества

При действии раствора желатина на водное извлечение *S. controversa* DC. наблюдали появление опалесценции. При проведении реакции по

Стиасни происходило выпадение осадка кирпично-красного цвета, а при добавлении ЖАК к раствору после отделения осадка – появление фиолетовой окраски. Из полученных данных следует, что в сырье присутствуют дубильные вещества смешанной группы (конденсируемые и гидролизуемые танины).

### **Кумарины**

После действия 5% раствора NaOH на спиртовое извлечение, наблюдали интенсивную желтую окраску, а после прибавления диазореактива – красное окрашивание. При проведении лактонной пробы наблюдали образование суспензии белого цвета, не растворимой в воде, что свидетельствует о наличии в сырье кумаринов.

### **Флавоноиды**

При выполнении пробы Синода наблюдали появление малинового окрашивания, после прибавления октанола – розовое окрашивание органического (агликоны флавоноидов) и водного слоя (гликозиды флавоноидов). Реакция с раствором  $AlCl_3$  привела к образованию светло-желтого раствора. При прибавлении реактива Вильсона к исследуемому раствору наблюдали появление ярко-желтого окрашивания. Количественное содержание флавоноидов в пересчете на рутин составило  $1,51 \pm 0,67 \%$ .

### **Фенолкарбоновые кислоты**

Методом БХ выявили наличие фенолкарбоновых кислот в спиртовом извлечении. Содержание фенолкарбоновых кислот в пересчете на хлорогеновую кислоту, определенное спектрофотометрически, составило  $4,46\% \pm 0,76\%$  в пересчете на воздушно-сухое сырье.

### **Алкалоиды**

В кислом извлечении из листьев *S. controversa* DC. с реактивами Бушарда, Драгендорфа, Несслера и Зонненштейна наблюдались слабо выраженные положительные реакции в извлечении А, что может указывать на содержание в растении алкалоидов в следовых количествах.

### Эфирное масло

Выход эфирного масла (ЭМ) из листьев *S. controversa* DC. составил 0,51 %  $\pm$  0,07%. В нем идентифицировано 52 компонента, с преобладанием кислородсодержащих терпеноидов. Обнаружены кислородсодержащие сесквитерпеноиды: кариофиллен оксид (10,4%), гумулен-6.7-оксид (6,2%), спатуленол (3,7%). ЭМ отличается высоким содержанием одноосновных насыщенных карбоновых кислот, в частности нонановой (15,7%) и пальмитиновой кислот (9,7%). Значительная доля в составе приходится на нонаналь (6,4%) и кариофилла-3.8(13)-диен-5 $\alpha$ -ол (2,7%). Ввиду низкого содержания ЭМ вид не является перспективным для его выделения и представляет научный интерес для исследования хемотаксономических признаков внутри рода *Saussurea* DC. Основные данные по химическому составу ЭМ приведены в таблице 6.

Таблица 6 – Химический состав эфирного масла листьев *S. controversa* DC.

№ п/п	Компонент	Время удерживания, мин	Содержание, %
1	октаналь	10,417	0,2
2	линалоол	13,840	1,2
3	нонаналь	14,030	6,4
4	октановая кислота	16,572	0,5
5	$\alpha$ -терпинеол	17,089	0,6
6	метилсалицилат	17,237	0,2
7	хризантенон	17,416	0,2
8	деканаль	17,595	0,8
9	$\beta$ -циклоцитраль	18,149	0,2
10	гераниол	19,272	0,2
11	нонановая кислота	20,169	15,7

12	дигидроэдулан	20,654	0,8
13	теаспиран А	20,818	0,6
14	ундеканаль	21,055	0,7
15	теаспиран В	21,382	0,4
16	эвгенол	22,732	0,2
17	декановая кислота	23,254	1,7
18	додеканаль	24,341	0,9
19	кариофиллен	24,752	0,5
20	геранилацетон	25,723	0,3
21	гумулен	25,807	0,3
22	ундекановая кислота	26,234	1,7
23	гермакрен D	26,667	0,2
24	$\beta$ -селинен	26,809	0,7
25	тридеканаль	27,463	0,3
26	$\gamma$ -кадинен	27,653	0,4
27	$\alpha$ -кадинен	27,927	1,0
28	$\alpha$ -калакорен	28,512	0,1
29	изокариофиллен- $\alpha$ -оксид	28,824	1,5
30	додекановая кислота	29,098	1,2
31	1.5-эпоксисальвиал-4(14)-ен	29,214	1,4
32	спатуленол	29,525	3,7
33	окись кариофиллена	29,694	10,4
34	сальвиал-4(14)-ен-1-он	30,010	1,1
35	гумулен-2.3-оксид	30,163	0,3
36	гумулен-6.7-оксид	30,443	6,2
37	кариофилла-4(12).8(13)-диен-5а-ол	31,213	0,6

38	$\beta$ -эвдесмол	31,582	1,0
39	$\alpha$ -кадинол	31,693	1,3
40	кариофилла-3.8(13)-диен-5 $\alpha$ -ол	32,141	2,7
41	эвдесма-4(15).7-диен-1 $\beta$ -ол	32,563	1,6
42	пентадеканаль	33,217	0,5
43	тетрадекановая кислота	34,498	1,0
44	гексадеканаль	35,891	0,2
45	пентадекановая кислота	36,998	0,3
46	бензилсалицилат	37,288	0,6
47	гептадеканаль	38,454	0,5
48	пальмитиновая кислота	39,440	9,7
49	маноол	41,782	0,2
50	фитол	42,984	0,2
51	эйкозаналь	45,410	0,3
52	докозаналь	49,587	0,2

### Полисахариды

При воздействии 4-х кратного объема этанола 95 % на водное извлечение *S. controversa* DC. наблюдали появление белого хлопьевидного осадка, что свидетельствует о присутствии полисахаридов в растительном сырье. После нагревания извлечения с антронсерным реактивом наблюдали бирюзовое окрашивание. Учитывая, что большинство ПС обладают противовоспалительной и иммуностропной активностью [29,34,35,162], они были подробно исследованы.

### Исследование элементного состава

В ходе исследования установлено содержание в листьях *S. controversa* DC. 44 элементов, из которых 15 относятся к биогенным. Так, обнаружено 5

макроэлементов Ca, K, Mg, P, Na; 6 эссенциальных элементов: Fe, Mn, Zn, Cu, Mo, Cr, и 4 условно-эссенциальных элемента: Si, B, V, Li (таблица 7).

Таблица 7 – Содержание макроэлементов, эссенциальных и условно-эссенциальных микроэлементов в листьях *S. controversa* DC., n=5, X±x, мг/кг.

№ п/п	Элемент	Содержание мг/кг
1	Ca	41380 ± 6210
2	K	15196 ± 2279
3	Mg	2826 ± 423
4	P	1378 ± 207
5	Na	193 ± 29
6	Fe	612 ± 86
7	Mn	68 ± 20
8	Zn	20 ± 3
9	Cu	5,4± 1,1
10	Mo	7,9± 2,0
11	Cr	2,0 ± 0,5
12	Si	673 ± 117
13	B	17,4 ± 4,5
14	V	1,1 ± 0,3
15	Li	0,4 ± 0,1

Как видно из таблицы 5 в сырье *S. controversa* DC. содержатся биогенные элементы, участвующие в метаболизме костной ткани - Ca, Mg, P, B, V. Стоит отметить значительное содержание Ca (41380 мг/кг) и P (1378

мг/кг). Помимо вышеназванных элементов, в сырье были обнаружены тяжелые металлы Pb, Cd, Hg, а так же As, при этом их количественное содержание не превышало предельно допустимые значения (таблица 8).

Таблица 8 –Содержание тяжелых металлов и мышьяка в листьях *S. controversa* DC., n=5,  $\bar{X} \pm x$ , мг/кг.

Элемент	Содержание, мг/кг	Предельно допустимое содержание, мг/кг*
Pb	0,29 ± 0,04	6,0
Cd	0,34 ± 0,05	1,0
Hg	0,0059 ± 0,0009	0,1
As	<0,4	0,5

Примечание: \* В соответствии с ГФ 14 изд. ОФС.1.5.3.0009.15 [25,70].

Таким образом, используемое в исследовании сырье отвечает фармакопейным требованиям безопасности по уровню содержания тяжелых металлов. Кроме того, в сырье обнаружено 25 абиогенных элементов, т.е. биологическая роль которых достоверно не установлена (таблица 9).

Таблица 9 – Абиогенные элементы в листьях *S. controversa* DC.; n=5,  $\bar{X} \pm x$ , мг/кг

№ п/п	Элемент	Содержание в сырье, мг/кг
1	Бериллий (Be)	0,020 ± 0,003
2	Титан (Ti)	54,83 ± 8,22
3	Кобальт (Co)	0,50 ± 0,075
4	Галлий (Ga)	0,18 ± 0,027
5	Рубидий (Rb)	5,53 ± 0,83
6	Итрий (Y)	0,22 ± 0,03
7	Цирконий (Zr)	1,53 ± 0,23
8	Ниобий (Nb)	0,13 ± 0,02
9	Серебро (Ag)	0,032 ± 0,005
10	Цезий (Cs)	0,027 ± 0,004
11	Лантан (La)	0,31 ± 0,04
12	Церий (Ce)	0,61 ± 0,09

13	Празеодим (Pr)	0,076 ± 0,011
14	Неодим (Nd)	0,29 ± 0,04
15	Самарий (Sm)	0,075 ± 0,011
16	Гадолиний (Gd)	0,053 ± 0,009
17	Тербий (Tb)	0,0066 ± 0,001
18	Диспрозий (Dy)	0,049 ± 0,007
19	Гольмий (Ho)	0,010 ± 0,001
20	Эрбий (Er)	0,024 ± 0,004
21	Иттербий (Yb)	0,023 ± 0,003
22	Лютеций (Lu)	0,0042 ± 0,0006
23	Гафний (Hf)	0,029 ± 0,004
24	Вольфрам (W)	0,074 ± 0,011
25	Золото (Au)	0,018 ± 0,003

### 3.2. Выделение и характеристика полисахаридов

#### 3.2.1. Выделение полисахаридных фракций

По разработанной технологической схеме (рег. № 2018146344 от 24.12.2018) (рисунок 7) были получены три полисахаридные фракции: ФПС<sub>1</sub> - экстрагируемая водой очищенной при t=25°C; ФПС<sub>2</sub> - экстрагируемая водой очищенной при t=70°C и ФПВ - пектиновые вещества, экстрагируемые 0,7 % водным раствором оксалата аммония (таблица 10).

Таблица 10 – Внешний вид и технологический выход полисахаридных фракций *S. controversa* DC., n=3, X±x,

Полисахаридные фракции	Внешний вид	Выход, % в пересчете на абсолютно сухое сырье
ФПС <sub>1</sub>	Коричневато-белый хлопьевидный порошок	1,93 ± 0,35
ФПС <sub>2</sub>	Бурый хлопьевидный порошок	0,74 ± 0,16
ФПВ	Белая пористая масса	10,52 ± 1,58

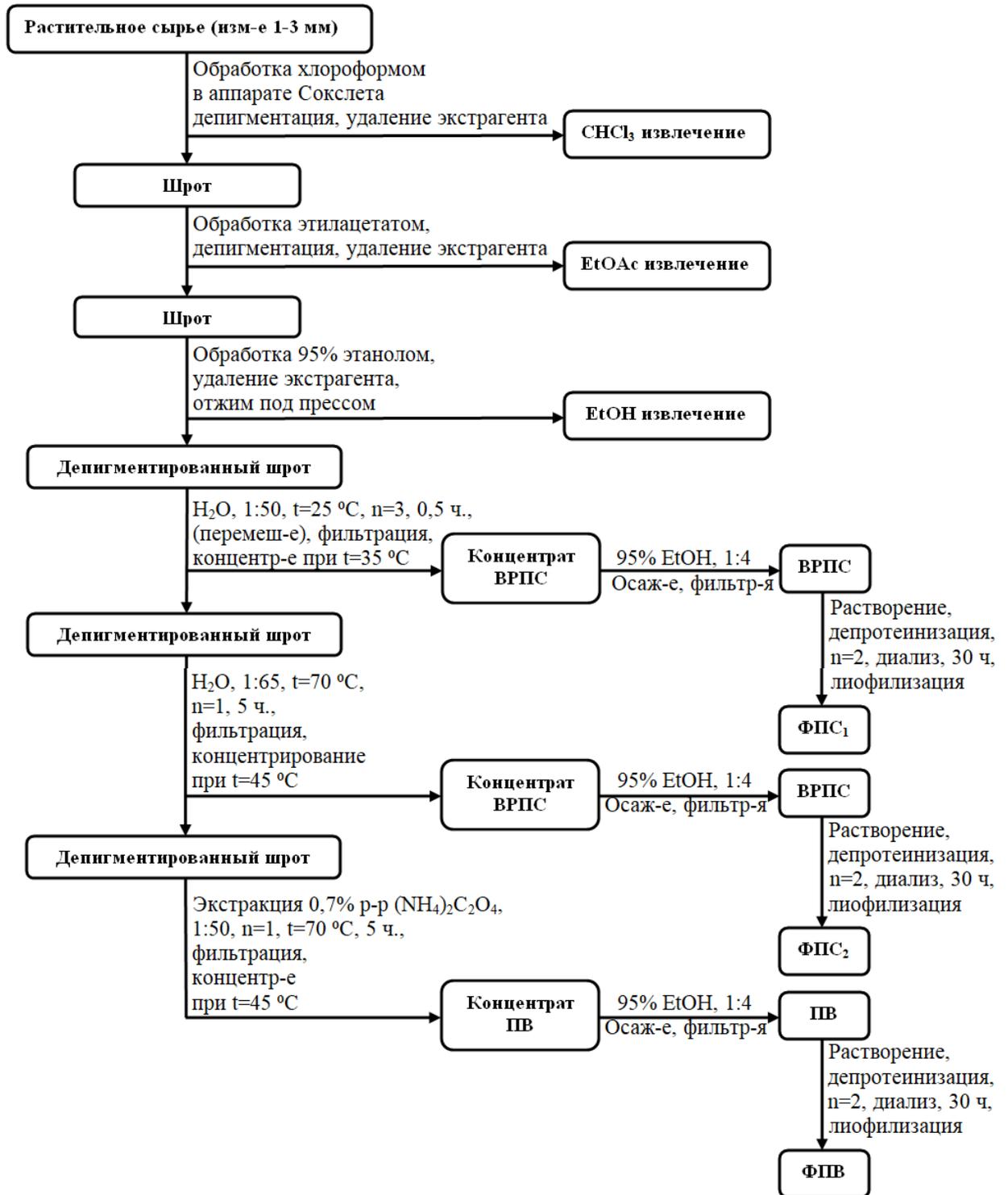


Рисунок 7 – Схема выделения фракций ПС из водного извлечения *S.controversa* DC.

### 3.2.2. Определение молекулярно-массового распределения

В результате эксклюзионной хроматографии установлена высокая степень гетерогенности полученных фракций (таблица 11).

Таблица 11 – Показатели молекулярных масс фракций ПС *S. controversa* DC.

Полисахаридные фракции	Показатели молекулярных масс		
	Mw, кДа	Mn, кДа	Mw/ Mn
ФПС <sub>1</sub>	448,1	13,2	33,9
ФПС <sub>2</sub>	101,82	10,27	9,9
ФПВ	1430,8	91,9	15,6

Примечание: Mw- средневесовая молекулярная масса

Mn- среднечисленная молекулярная масса

Необходимо отметить высокие значения молекулярных масс у ФПС<sub>1</sub> и ФПВ, так как по данным литературы полисахариды с высокой молекулярной массой могут являться носителями иммуностропной активности [159,163].

### 3.2.3. Определение содержания белка в полисахаридах

Для определения белка использовали калибровочный график, построенный по стандартным растворам сывороточного альбумина (рисунок 7, А). Содержание белка в полученных фракциях ПС существенно различалось. Так, в ФПС<sub>1</sub> полученных экстракцией холодной водой и депротеинизированных по методу Севага белок не обнаружен. В ФПС<sub>2</sub>, несмотря на многократную депротеинизацию, обнаружено значительное количества остаточного белка -  $26,22 \pm 0,68\%$ , а в ФПВ содержание остаточного белка составило  $2,51 \pm 0,14\%$ .

### 3.2.4. Определение уроновых кислот и моносахаридного состава

Для определения уроновых кислот использовали калибровочный график, построенный по стандартным растворам галактуроновой кислоты (рисунок 8 Б). При определении уроновых кислот установлено различие в их содержании во всех фракциях ПС. Так, в ФПС<sub>1</sub> их количество составило  $59,54 \pm 0,35\%$ , в ФПС<sub>2</sub> –  $64,20 \pm 0,59$  соответственно. В ФПВ обнаружено  $94,73 \pm$

0,26% УК, что свидетельствует о преобладании галактуроновой кислоты в составе пектиновых веществ.

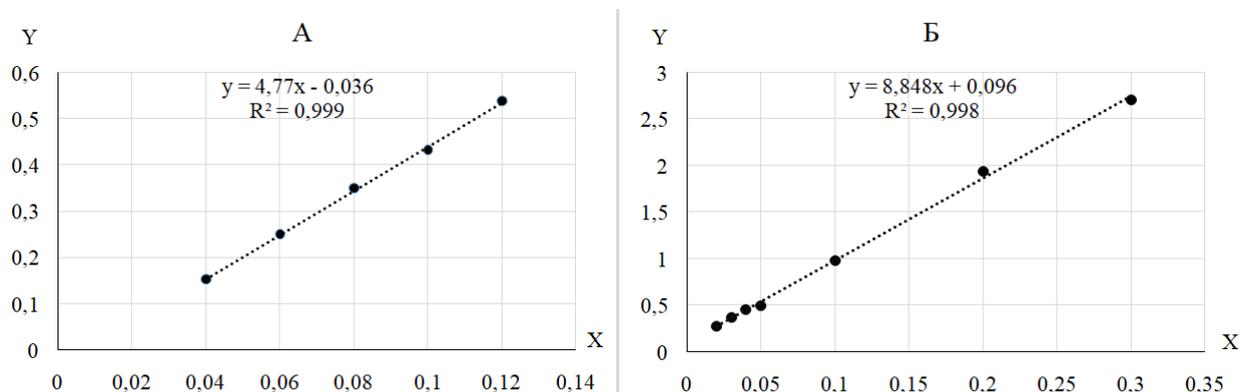


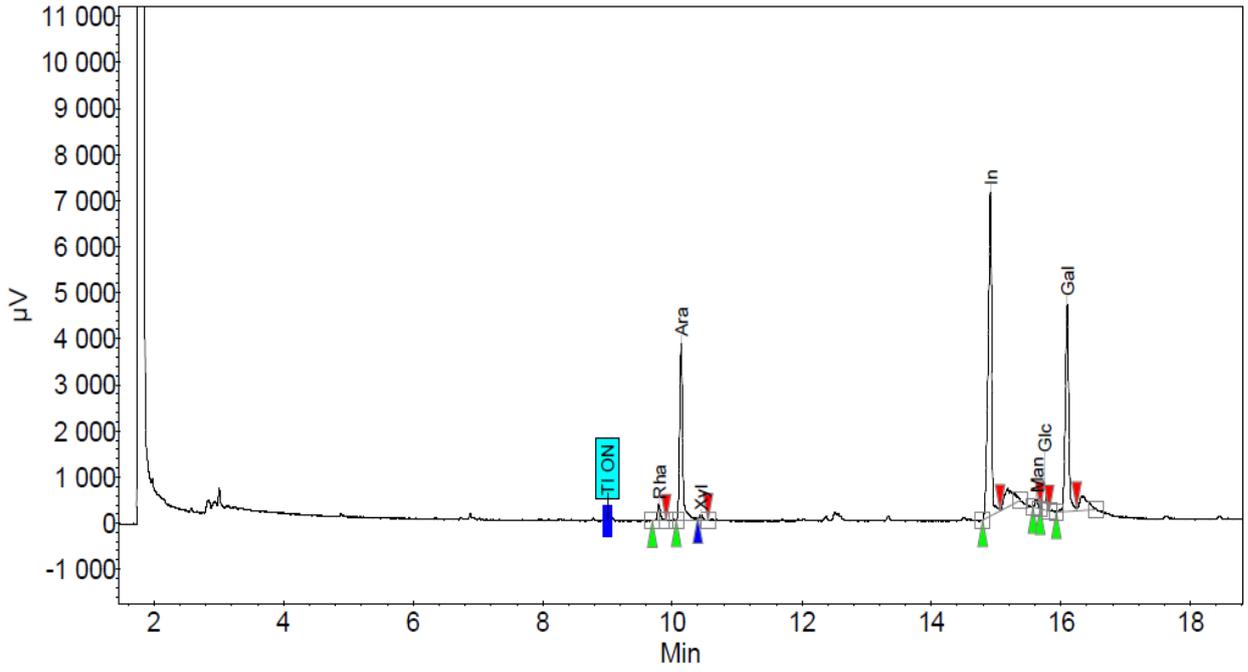
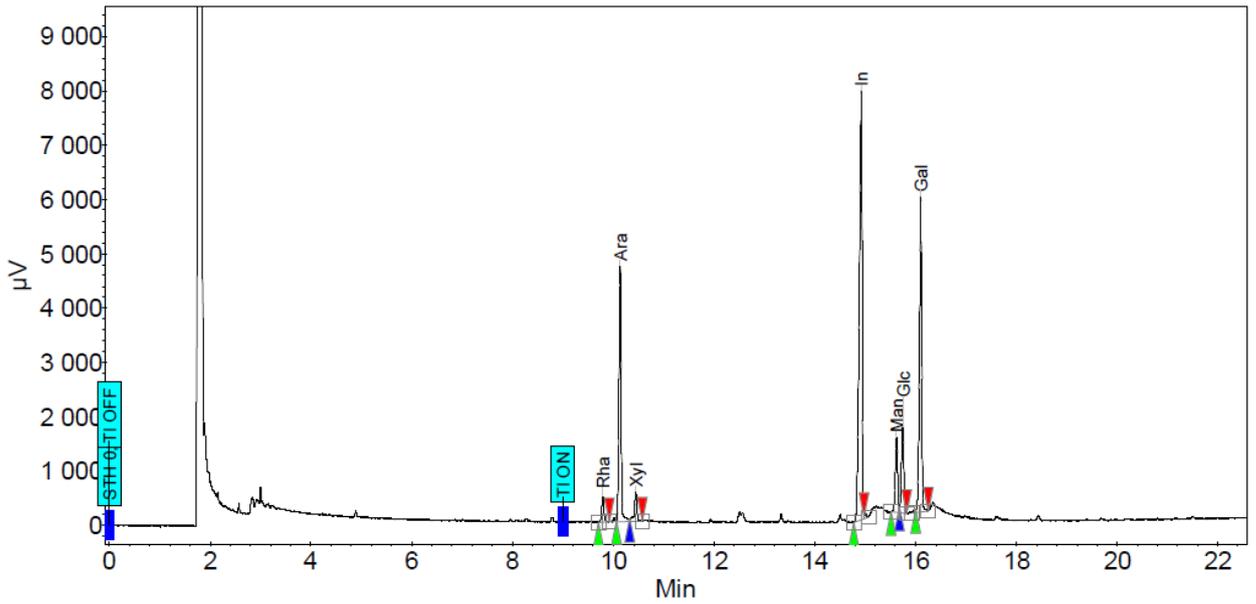
Рисунок 8 – Калибровочные графики: А – по сывороточному альбумину для определения белка; Б – по галактуроновой кислоте для определения уроновых кислот

Результаты ГЖХ ацетатов полиолов фракций ПС представлены в таблице 12, хроматограммы – на рисунках 9-11. Из результатов анализа моносахаридного состава фракций ПС и уроновых кислот следует, что последние являются доминирующими компонентами фракций ФПС<sub>1</sub>, ФПС<sub>2</sub> и в большей степени ФПВ. В качестве мажорных моноз выступают галактоза и арабиноза, а остатки рамнозы, ксилозы, маннозы и глюкозы являются минорными компонентами. При этом манноза в ФПВ отсутствует.

Таблица 12 – Результаты ГЖХ моносахаридного состава фракций ПС *S. controversa* DC.

Фракции ПС	Содержание нейтральных полисахаридов, %					
	Rha	Ara	Xyl	Man	Glc	Gal
ФПС <sub>1</sub>	1,65	12,47	2,32	0,67	1,74	21,60
ФПС <sub>2</sub>	0,28	1,87	0,74	1,67	0,83	4,18
ФПВ	0,42	1,87	0,05	-	0,12	0,86

Примечание: «-» моносахарид отсутствует в составе фракции ПС

Рисунок 9 – Хроматограмма ацетатов полиолов ФПС<sub>1</sub>Рисунок 10 – Хроматограмма ацетатов полиолов ФПС<sub>2</sub>

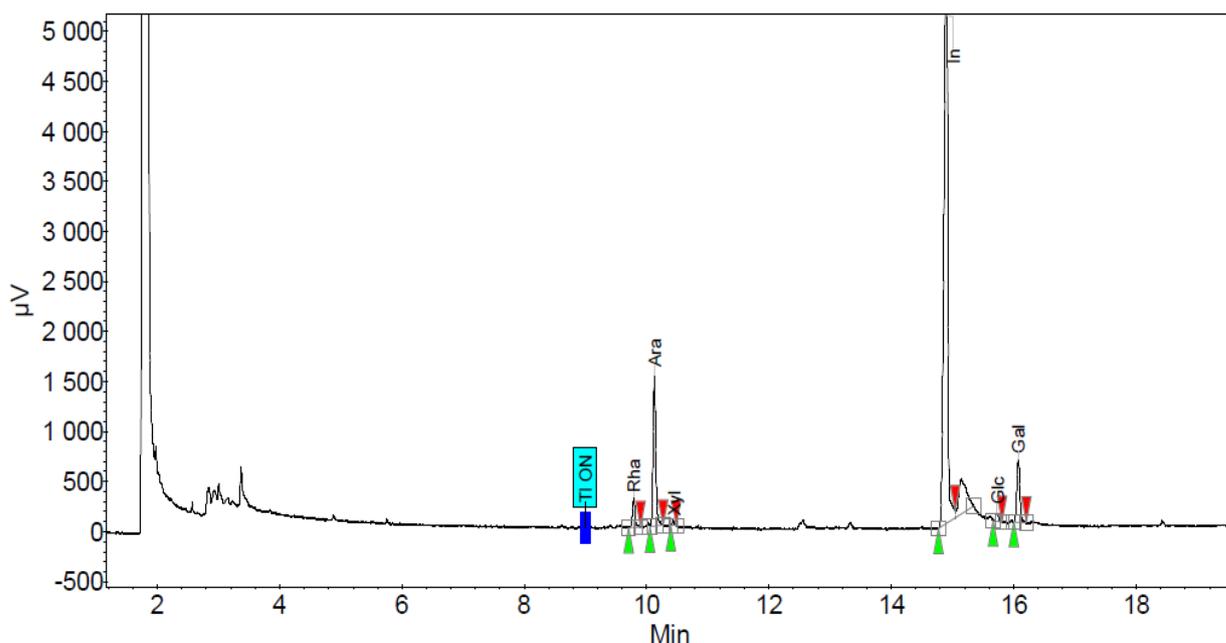


Рисунок 11 – Хроматограмма ацетатов полиолов ФПВ

### 3.3. Получение, фракционирование и установление компонентного состава экстракта листьев *S. controversa* DC. на 40% этаноле

#### 3.3.1. Получение и фракционирование экстракта

100,0 г воздушно-сухого сырья измельчали до размера частиц 3-6 мм, помещали в коническую колбу со шлифом, заливали 40% этанолом, гидромодуль 1:10. Колбу устанавливали на водяную баню, присоединяли обратный холодильник и проводили трехкратную экстракцию при температуре 80°C в течение 0,5 ч каждую. Извлечения фильтровали через 4 слоя марли и бумажный фильтр. Фильтраты объединяли и концентрировали под вакуумом на роторном испарителе до густого остатка при температуре не выше 45°C. Сгущенный остаток высушивали под термовентилятором при температуре 35°C. Сухой экстракт растворяли в воде очищенной в соотношении 1:5, выпавший осадок (ОЭ) отделяли на воронке Бюхнера и промывали водой очищенной. Водный концентрат - фильтрат без осадка, помещали в делительную воронку и последовательно проводили экстракцию в соотношении 1:2, при кратности  $n=3$ , рядом растворителей с возрастающей полярностью: хлороформ – этилацетат – н-бутанол. Растворители удаляли

под вакуумом, густые остатки высушивали. Таким образом, получены хлороформная (ХЛФ), этилацетатная (ЭАФ), бутанольная (БФ) фракции и водный остаток (ВО) после экстракции органическими растворителями.

Схема получения и фракционирования водно-спиртового экстракта представлена на рисунке 12.

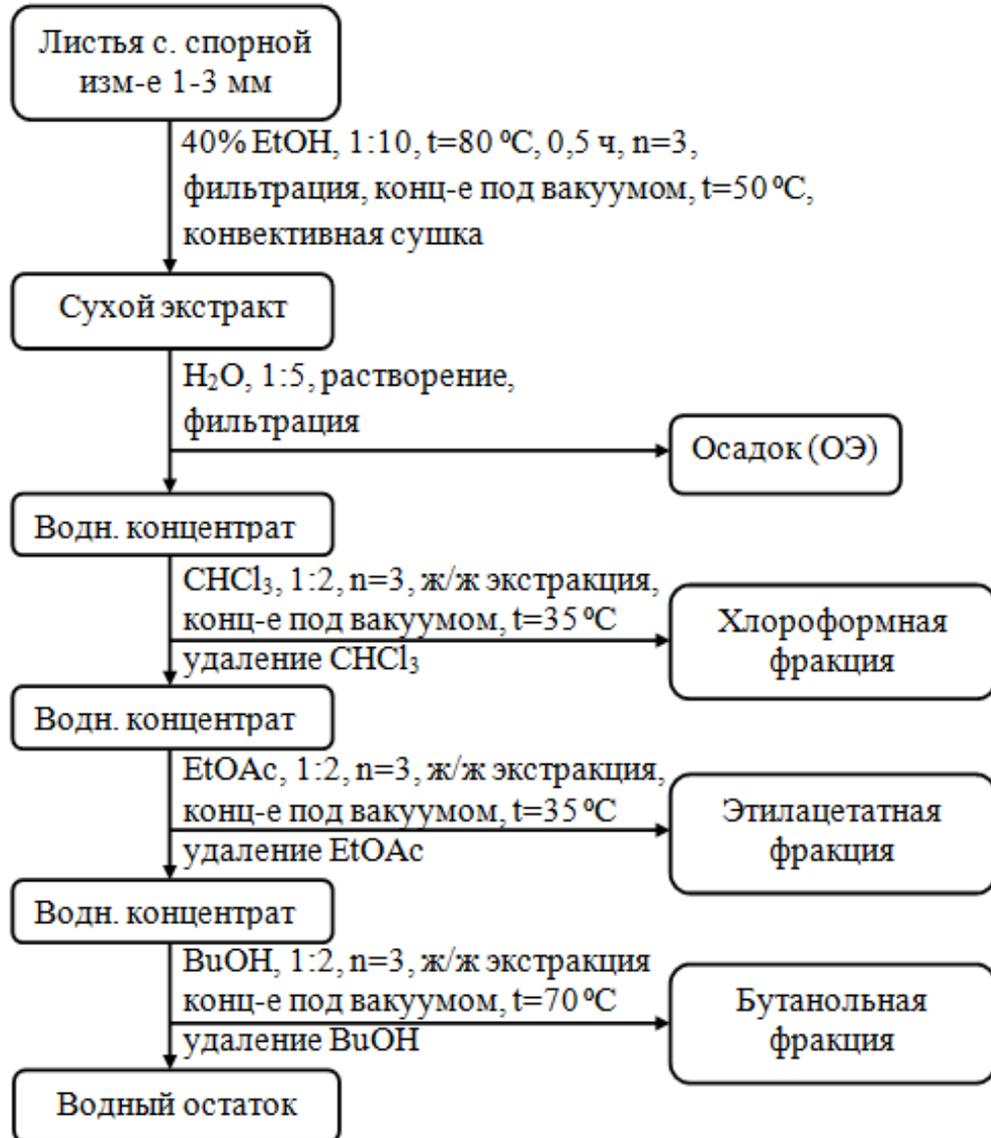


Рисунок 12– Схема получения и разделения экстракта *S. controversa* DC. на 40% этаноле

Выход экстракта составил  $39,4\% \pm 0,3\%$ . Выходы фракций после обработки экстракта органическими растворителями согласно схеме (рисунок 12), представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Описание и технологические выходы фракций экстракта  
*S. controversa* DC.

Фракция	Выход (%), в пересчете на абс. сух. экстракт, n=3, $X \pm x$ ,	Внешний вид
ОЭ	$2,30 \pm 0,24$	Аморфный, сыпучий желтовато-белый порошок
ХЛФ	$1,36 \pm 0,11$	Темно-зеленая вязкая масса
ЭАФ	$3,20 \pm 0,35$	Светло-зеленая вязкая масса
БФ	$8,50 \pm 1,02$	Коричнево-желтый порошок
ВО	$86,94 \pm 3,17$	Коричневый аморфный гигроскопичный порошок

Как видно из таблицы 13, большинство БАВ экстракта на 40% этаноле имеют гидрофильную природу. Все полученные фракции были подвергнуты кислотному гидролизу. Агликоны из гидролизата извлекали хлороформом и этилацетатом. Состав гидролизованных и нативных фракций исследовали хроматографическими методами.

### 3.3.2. Хроматографический анализ экстракта и фракций

В ходе хроматографического анализа (ТСХ) кумаринов как в нативных ХЛФ, ЭАФ, так и липофильной части гидролизата ЭАФ обнаружены два соединения с голубой и желтой зонами адсорбции в УФ свете. Подвижность фракций ( $R_f$ ) указана в таблице 14. Вещества идентифицировали с РСО умбеллиферона и эскулетина.

Примечательно, что в гидролизате ЭАФ также обнаружены эскулетин и умбеллиферон, что может свидетельствовать о нахождении данных соединений в нативной ЭАФ в виде гликозидов.

Таблица 14 – Результаты идентификации кумаринов во фракциях  
*S. controversa* DC.

Объект	R <sub>f</sub> в различных системах растворителей (ТСХ)			Идентифицированный компонент
	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :EtOAc (70:30)	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O (50:50)	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (33:65:2)	
ХЛФ	0,74	0,62	0,38	Умбеллиферон
	-	-	-	Эскулетин
гидролизат ХЛФ	-	-	-	Умбеллиферон
	-	-	-	Эскулетин
ЭАФ	-	-	-	Умбеллиферон
	0,64	0,53	0,44	Эскулетин
гидролизат ЭАФ	0,74	0,62	0,38	Умбеллиферон
	0,64	0,53	0,44	Эскулетин

При исследовании хроматограмм ХЛФ, гидролизатов БФ и ВО на присутствие тритерпеновых сапонинов, после обработки кремневольфрамовой кислотой, выявлены два вещества с серо-синей окраской в видимом свете, подвижность фракций представлена в таблице 15. В сравнении с РСО в ХЛФ идентифицирована олеаноловая кислота, а в гидролизатах БФ и ВО – урсоловая кислота, что свидетельствует о ее нахождении в последних в форме гликозидов.

Таблица 15 – Результаты идентификации тритерпеновых сапонинов во фракциях *S. controversa* DC.

Объект	R <sub>f</sub> в различных системах растворителей (ТСХ)			Идентифицированный компонент
	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> :C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O:CH <sub>3</sub> COOH (19:80:1)	CHCl <sub>3</sub> :C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O (70:30)	CHCl <sub>3</sub> :MeOH:CH <sub>3</sub> COOH (94:5,5:0,5)	
ХЛФ фракция	0,23	0,33	0,49	Олеаноловая кислота
БФ гидролизат	0,19	0,37	0,40	Урсоловая кислота
ВО гидролизат	0,19	0,37	0,40	Урсоловая кислота

При хроматографическом анализе флавоноидов в ЭАФ, БФ, ВО и в их гидролизатах выявлены три вещества флавоноидной природы с зонами

желто-зеленой флуоресценции в УФ-свете при 254 нм после обработки 5% раствором  $AlCl_3$ . Вещества идентифицированы в сравнении с РСО, как кверцетин, кемпферол и рутин (таблица 16).

Таблица 16 – Результаты идентификации флавоноидов во фракциях *S. controversa* DC.

Объект	$R_f$ в различных системах растворителей			Идентифицированный компонент
	$H_2O:CH_3COOH$ (85:15) (БХ)	$H_2O:CH_3COOH$ (40:60) (БХ)	$n-BuOH:$ $CH_3COOH:H_2O$ (40:10:50) (ТСХ)	
ЭАФ	0,05	0,37	0,55	Кверцетин
БФ гидролизат	0,07	0,53	0,82	Кемпферол
ВО	0,53	0,72	0,42	Рутин

Фенолкарбоновые кислоты определяли в ЭАФ, БФ и ВО. На хроматограммах наблюдали 5 голубых и фиолетовых зон адсорбции в УФ-свете. Вещества идентифицированы в сравнении с РСО, как коричневая, кофейная, хлорогеновая, галловая и хинная кислоты (таблица 17).

Таблица 17 – Результаты идентификации фенолкарбоновых кислот во фракциях *S. controversa* DC.

Объект	$R_f$ в различных системах растворителей			Идентифицированный компонент
	$H_2O:CH_3COOH$ (95:5) (БХ)	$H_2O:CH_3COOH$ (85:15) (БХ)	$EtOAc:H_2O:$ $HCOOH$ (65:20:15) (ТСХ)	
ЭАФ	0,65	0,75	0,73	Кофейная кислота
	0,81	0,71	0,42	Галловая кислота
БФ	0,65	0,75	0,73	Кофейная кислота
	0,81	0,71	0,42	Галловая кислота
	0,73	0,47	0,61	Хлорогеновая кислота
	0,22	0,35	0,87	Коричневая

				кислота
ВО	0,73	0,47	0,61	Хлорогеновая кислота
	0,92	0,85	0,33	Хинная кислота

В ходе исследования ВО на содержание аминокислот обнаружено 5 зон адсорбции с различной окраской после обработки раствором нингидрина. Вещества идентифицированы в сравнении с стандартными образцами, как валин, аргинин, треонин, лизин и глицин (таблица 18).

Таблица 18 – Результаты идентификации аминокислот  
во фракциях *S. controversa* DC.

Объект	R <sub>f</sub> в различных системах растворителей (БХ)		Идентифициро ванный компонент
	н-BuOH: CH <sub>3</sub> COOH : H <sub>2</sub> O (40:10:50)	н-BuOH: C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N: H <sub>2</sub> O (6:4:3)	
ВО	0,53	0,35	Валин
	0,11	0,18	Аргинин
	0,27	0,37	Треонин
	0,15	0,19	Лизин
	0,20	0,30	Глицин

Хроматографическому анализу (БХ и ТСХ) на присутствие свободных и связанных углеводов подвергли нативный ВО и водную часть гидролизатов ЭАФ, БФ и ВО. Выявлено 4 соединения углеводной природы. Данные вещества в сравнении с РСО идентифицированы как D-ксилоза, D-глюкоза, L-арабиноза и L-рамноза. В гидролизате ЭАФ обнаружена L-рамноза, что свидетельствует о наличии в нативной фракции гликозида с данным углеводным компонентом. В гидролизате БФ выявлены L-рамноза, D-ксилоза, D-глюкоза, что также указывает на их гликозидную структуру в нативной фракции. В ВО обнаружена свободная D-ксилоза. В гидролизате ВО, помимо D-ксилозы, обнаружены D-глюкоза, L-арабиноза и L-рамноза, что указывает на возможное присутствие полисахаридного комплекса в нативном водном остатке (таблица 19).

Таблица 19 – Результаты идентификации углеводов  
во фракциях *S. controversa* DC.

Объект	R <sub>f</sub> в различных системах растворителей		Идентифицированный компонент
	н-ВuOH:C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N: H <sub>2</sub> O (6:4:3) (БХ)	EtOAc:HCOOH: CH <sub>3</sub> COOH:H <sub>2</sub> O (60:15:15:10) (ТСХ)	
ВО	0,49	0,57	L-рамноза
ЭА гидролизат (водн. ч.)	0,49	0,57	L-рамноза
БФ гидролизат (водн. ч.)	0,49	0,57	L-рамноза
	0,45	0,23	D-ксилоза
	0,36	0,43	D-глюкоза
ВО гидролизат (водн.ч)	0,42	0,52	L-арабиноза
	0,49	0,57	L-рамноза
	0,45	0,23	D-ксилоза
	0,36	0,43	D-глюкоза

В результате ВЭЖХ анализа в экстракте на 40% этаноле обнаружено 37 соединений, 6 из которых являются мажорными компонентами (рисунок 13).

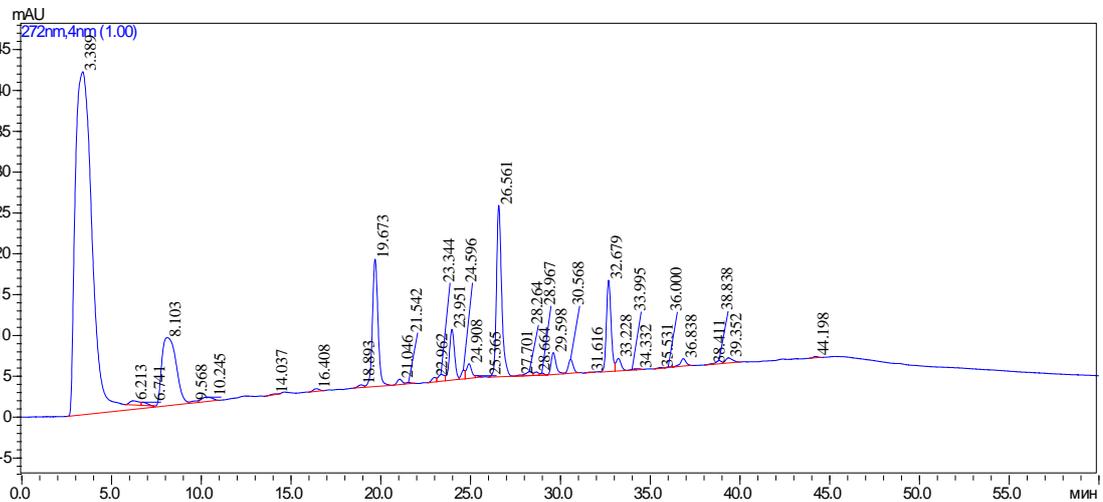


Рисунок 13 – ВЭЖХ водно-спиртового экстракта *S. controversa* DC.

Времена удерживания, максимумы поглощения веществ, их площадь и содержание (%), представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Хроматографические характеристики мажорных компонентов водно-спиртового экстракта

№ п/п	Время удерживания, мин.	Максимум поглощения, нм	Площадь пика, ЕОП×мин.	Содержание, %
1	3,389	200/271/655/678/492	2748435	58,94
2	8,103	326/218/235/655/405	463184	9,93
3	19,673	253/225/354/664	334399	7,17
4	23,951	237/199/329/655	123372	2,64
5	26,561	330/221/238/655	420548	9,02
6	32,679	238/330/678	203681	4,37

ВЭЖХ анализ ЭАФ показал присутствие 20 соединений (рисунок 14), из которых три со временами удерживания 13,394; 33,928 и 39,766 мин., идентифицированы как кофейная, салициловая кислоты и кверцетин соответственно.

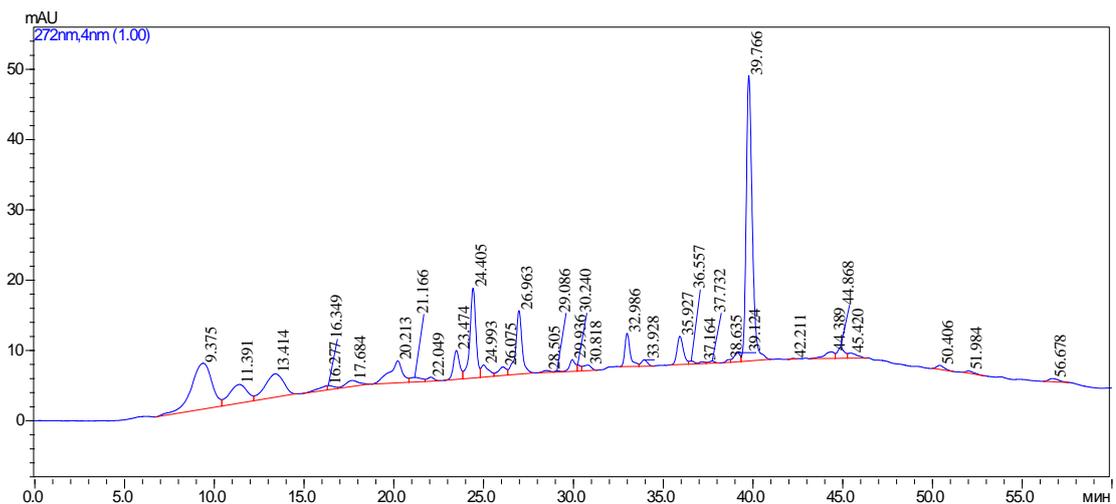


Рисунок 14 – ВЭЖХ ЭАФ экстракта *S. controversa* DC.

В результате исследования БФ обнаружено присутствие 31 соединения (рисунок 15).

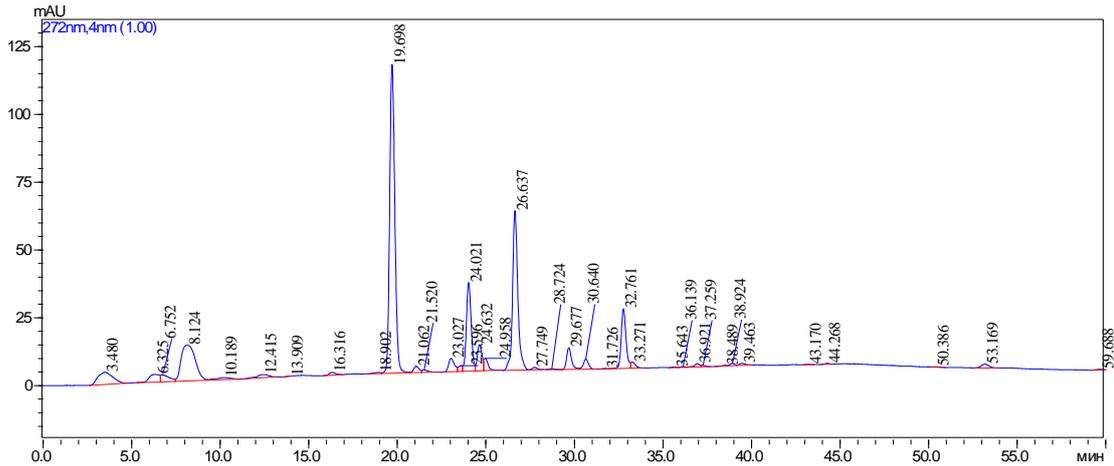


Рисунок 15 – ВЭЖХ БФ экстракта *S. controversa* DC.

Из них 3 вещества со временами удерживания 6,839; 8,133 и 21,061 мин идентифицированы как сирингин, хлорогеновая кислота и дигидрокверцетин соответственно. Их содержание во фракции составило 0,15; 8,82 и 0,67%. Кроме того, на хроматограмме присутствуют два мажорных (38,4% и 19,8%) пика неидентифицированных соединений со временами удерживания 19,697 и 26,637 минут соответственно [5].

ВЭЖХ анализ водного остатка показал присутствие 30 соединений (рисунок 16).

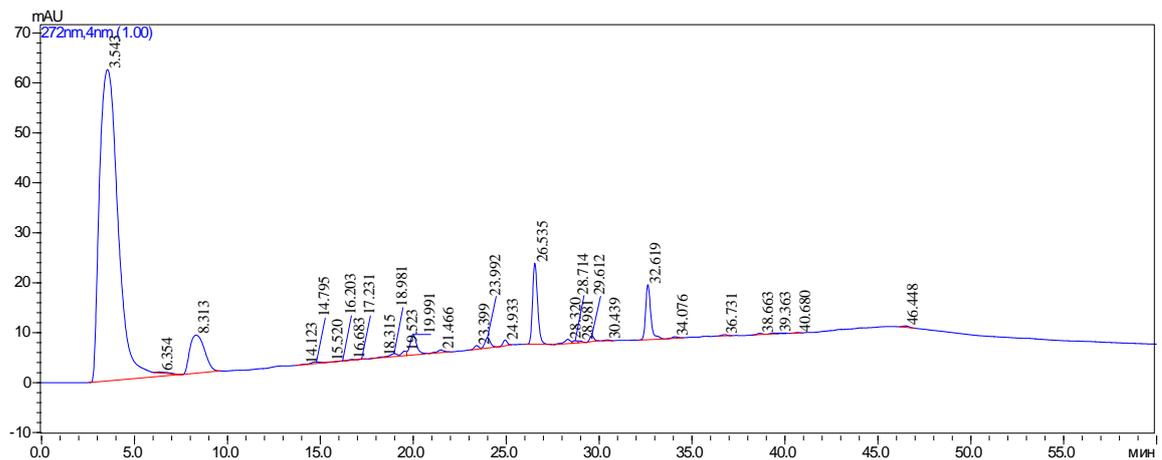


Рисунок 16 – ВЭЖХ ВО экстракта *S. controversa* DC.

Два вещества со временами удерживания 6,354 и 8,313 мин идентифицированы со стандартными образцами сирингина и хлорогеновой кислоты соответственно. Их количественное содержание в ВО составило 0,19% и 7,47% соответственно. Отмечено, что мажорный компонент со

временем удерживания 3,543 мин. обнаруженный нами ранее в исходном экстракте (3,389 мин.), практически полностью переходит в водный остаток после экстракции органическими растворителями.

Таким образом, в ходе проведенного ВЭЖХ анализа установлено, что два мажорных компонента экстракта в ходе жидкость-жидкостной экстракции концентрируются в бутанольной фракции и имеют по УФ-спектральным характеристикам флавоноидную природу. В водном остатке после экстракции органическими растворителями присутствует неидентифицированный макрокомпонент (58,94%).

В связи с высоким технологическим выходом (таблица 13) и многокомпонентным составом БФ и ВО являются перспективными для последующего углубленного химического анализа с выделением индивидуальных веществ и установлением их структуры.

### 3.3.3. Исследование бутанольной фракции экстракта

Бутанольную фракцию (БФ) полученную из этанольного экстракта упаривали под вакуумом при температуре 35°C, до полного удаления бутанола, остаток отстаивали 6 ч, получая при этом гетерогенную смесь состоящую из осадка (ОБФ) и надосадочной жидкости. Осадок переносили на стеклянный фильтр и высушивали (ОБФ). Затем проводили разделение ОБФ методом колоночной хроматографии [91]. Для этого стеклянную колонку с диаметром 2,5 см заполняли силикагелем с размером частиц 100/250 мкм, высота слоя сорбента 70 см. 1,5 г ОБФ вносили в колонку, элюирование осуществляли смесью этилацетат – этанол с увеличением концентрации последнего от 5 до 80%. В результате были выделены три соединения. Вещества перекристаллизовывали из смеси метанол-хлороформ в различных соотношениях.

Вещество БФ-1 – светло-желтый аморфный порошок (0,080 г), т. пл. 188-190 °С. УФ-спектр (MeOH),  $\lambda_{\max}$ , нм: 290, 355.  $[\alpha]_D^{25} + 48^\circ$  (с 0,28, EtOH).

Вещество БФ-2 – светло-желтый аморфный порошок (0,468 г), т. пл. 175-176 °С. УФ-спектр (MeOH),  $\lambda_{\max}$ , нм: 292, 357.  $[\alpha]_D^{25} + 66^\circ$  (с 0,42, EtOH). Элементный анализ: С - 50,66; Н - 5,05; О - 44,29. Рассчитанная молекулярная масса для  $C_{33}H_{40}O_{18}$  составила 724 г/моль.

Вещество БФ-3 – светло-желтый аморфный порошок (0,570 г), т. пл. 181-182 °С. УФ-спектр (MeOH),  $\lambda_{\max}$ , нм: 257, 360.

Гидролиз веществ (1%  $H_2SO_4$ ), с последующей с идентификацией ТСХ, показал присутствие кверцетина, глюкозы и рамнозы.

Характеристики химических сдвигов в спектрах ЯМР  $^1H$  ( $CD_3OD$ , 600 МГц) и ЯМР  $^{13}C$  ( $CD_3OD$ , 150 МГц) представлены в таблицах 21 и 22.

Таблица 21 – ЯМР  $^1\text{H}$  веществ, выделенных из БФ *S. controversa* DC. ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 600 МГц)

Атом	Химические сдвиги (м.д.)		
	БФ-1	БФ-2	БФ-3
6	6,26 (1H, д. 2,0)	6,24 (1H, д. 2,0)	6,24 (1H, д. 2,0)
7	-	-	-
8	6,43 (1H, д. 2,0)	6,43 (1H, д. 2,0)	6,43 (1H, д. 2,0)
2'	7,71 (1H, д. 2,0)	7,70 (1H, д. 2,0)	7,70 (1H, д. 2,0)
5'	6,91 (1H, д. 8,0)	6,91 (1H, д. 8,0)	6,91 (1H, д. 8,0)
6'	7,66 (1H, д.д. 8,0; 2,0)	7,66 (1H, д.д. 8,0; 2,0)	7,66 (1H, д.д. 8,0; 2,0)
5-OH	12,30	12,35	12,35
7-OH	-	7,87	7,95
3'-OH	8,08	8,08	8,08
4'-OH	8,11	8,20	8,15
1''' (1''')	5,00 (1H, д. 7,5)	5,15 (1H, д. 8,0)	5,14 (1H, д. 7,0)
2''' (2''')	3,56 (1H)	3,25-3,52 (8H, м.)	3,25-3,52 (4H, м.)
3''' (3''')	3,32 (1H)		
4''' (4''')	3,48 (1H)		
5''' (5''')	3,40 (1H)		
6''' (6''')	3,60 (1H, д.д. 10,0; 2,0); 3,81 (1H, д. 10,0)	3,57 (2H, д.д. 9,5; 2,0); 3,83 (2H, д. 10,0)	3,57 (1H, д.д. 9,5; 2,0); 3,84 (1H, д. 10,0)
1''	4,55 (1H, с.)	4,55 (1H, с.)	4,55 (1H, с.)
2''	3,12 (1H)	3,23-3,52 (4H, м.)	3,25-3,54 (4H, м.)
3''	3,28 (1H)		
4''	3,48 (1H)		
5''	3,30 (1H)		
6''	1,17 (3H, д. 6,0)	1,15 (3H, д. 6,0)	1,15 (3H, д. 6,0)

Таблица 22 – ЯМР  $^{13}\text{C}$  веществ, выделенных из БФ *S. controversa* DC.  
( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 150 МГц)

Атом	Химические сдвиги (м.д.)		
	БФ-1	БФ-2	БФ-3
2	158,16	158,51	158,52
3	135,54	135,62	135,62
4	179,08	179,41	179,43
5	162,51	162,99	163,00
6	99,84	99,94	99,95
7	165,65	166,03	166,05
8	94,81	94,83	94,86
9	159,17	159,33	159,34
10	105,40	105,62	105,63
1'	122,74	123,10	123,12
2'	117,50	117,67	117,68
3'	145,36	145,84	145,85
4'	149,41	149,81	149,81
5'	115,91	116,03	116,05
6'	123,39	123,54	123,55
1 <sup>'''</sup> (1 <sup>''''</sup> )	105,80	104,74; 104,67	104,71
2 <sup>'''</sup> (2 <sup>''''</sup> )	75,25	75,71	75,72
3 <sup>'''</sup> (3 <sup>''''</sup> )	76,74	77,20	77,22
4 <sup>'''</sup> (4 <sup>''''</sup> )	71,66	72,11	72,10
5 <sup>'''</sup> (5 <sup>''''</sup> )	77,87	78,16	78,18
6 <sup>'''</sup> (6 <sup>''''</sup> )	68,20	68,55; 68,51	68,55
1''	102,50	102,41	102,42
2''	71,91	72,21	72,23
3''	69,28	69,70	69,71
4''	70,81	71,37	71,39
5''	73,67	73,91	73,93
6''	17,75	17,89	17,88

При соотнесении данных спектра ЯМР  $^{13}\text{C}$  (таблица 22) с литературными данными установлено, что агликоном всех трех веществ является кверцетин. ЯМР  $^1\text{H}$  и ЯМР  $^{13}\text{C}$  спектры содержат сигналы характерные для глюкозы и рамнозы.

Химические сдвиги в спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  вещества БФ-1 при  $\delta$  68,20 м.д., а также дублет, характерный для аномерного протона глюкозы в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  при  $\delta$  5,00 м.д. ( $J = 7,5$  Гц) и синглет при  $\delta$  4,55 м.д. относящийся к рамнозе указывают на терминальное положение этих сахаров. Кроме того в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  вещества БФ-1 имеется сигнал при  $\delta$  12,30 м.д. характерный для свободной 5-ОН группы, и отсутствует характеристический сигнал для свободной 7-ой группы. При снятии УФ-спектра с добавлением ацетата натрия наблюдали отсутствие батохромного сдвига, однако в спектре с добавлением раствора хлорида циркония наблюдали выраженную батохромию, исчезающую после прибавления лимонной кислоты, что подтверждает присутствие свободной 5-ОН группы и замещение при 3-ОН и 7-ОН группах. Положение сахарных фрагментов, глюкозы при 3-ОН, а рамнозы при 7-ОН установлено на основании ключевых корреляций в спектре  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY.

Число протонов в спектре ЯМР  $^1\text{H}$  вещества БФ-2, а также химические сдвиги на спектре ЯМР  $^{13}\text{C}$  при  $\delta$  104,74, 104,67 и 102,41 м.д., указывают на присутствие двух остатков глюкозы и одного рамнозы.

В соединениях БФ-2 и БФ-3 сигналы при  $\delta$  68,55 м.д., 68,51 м.д. (БФ-2) и  $\delta$  68,55 м.д. (БФ-3) в  $^{13}\text{C}$  ЯМР спектрах и дублеты аномерных протонов в ПМР при  $\delta$  5,15 м.д. ( $J=8,0$  Гц) и  $\delta$  5,14 м.д. (БФ-2 и БФ-3 соответственно) указывают на положение глюкозы между С-3 агликона и молекулой рамнозы, а синглет рамнозы Н-1 при  $\delta$  4,55 – на терминальную позицию этого сахара. Сигналы в ПМР спектре для 5-ОН  $\delta$  12,35 м.д. (БФ-2 и БФ-3) и 7-ОН  $\delta$  7,87 м.д. (БФ-2),  $\delta$  7,95 м.д. (БФ-3), характеризуют свободное положение этих групп. Данные спектров  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CONX и  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  COLOC 2D

ЯМР соединений БФ-2 и БФ-3 позволили установить характер гликозидной связи между молекулами глюкозы и рамнозы при 3-ОН:  $C-6'' \rightarrow C-1'''$  (БФ-2 и БФ-3) и  $C-6''' \rightarrow C-1''''$  (БФ-2).  $\beta$ -конфигурация остатков глюкозы и  $\alpha$ -конфигурация рамнозы доказана на основании величин соответствующих констант взаимодействия J (таблица 22).

В результате установлены структуры изолированных из БФ соединений.

**БФ-1:** 5,3',4'-тригидроксифлавонол-7-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид-3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид (кверцетин-7-О- $\beta$ -D-глюкопиранозил-3-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид);

**БФ-2:** 5,7,3',4'-тетрагидроксифлавонол-3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -D-глюкопиранозид-(1 $\rightarrow$ 6)-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид (кверцетин-3-О- $\beta$ -D-диглюкопиранозил-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид);

**БФ-3:** 5,7,3',4'-тетрагидроксифлавонол-3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозид-(1 $\rightarrow$ 6)-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид (кверцетин-3-О- $\beta$ -D-глюкопиранозил-О- $\alpha$ -L-рамнопиранозид (рутин)).

Структурные формулы соединений представлены на рисунке 17.

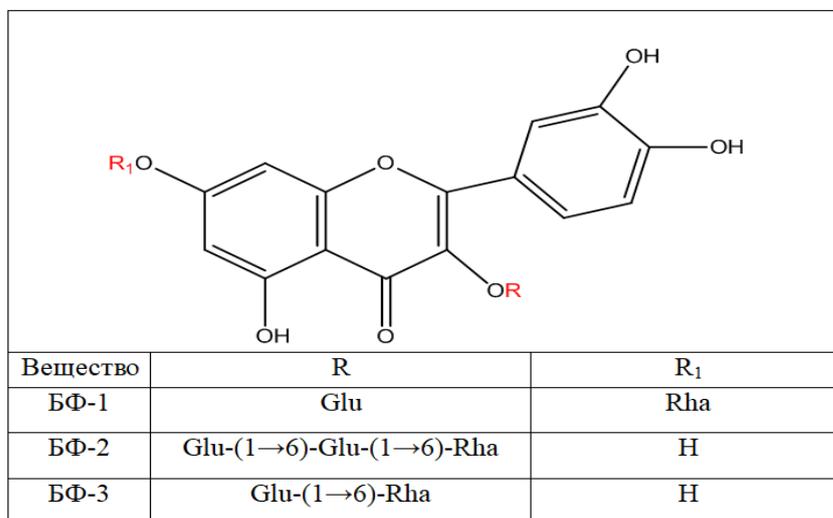


Рисунок 17 – Структурные формулы веществ БФ-1, БФ-2 и БФ-3

### 3.3.4. Исследование водного остатка экстракта

Водный остаток экстракта на 40% этаноле после экстракции органическими растворителями, упаривали под вакуумом и осаждали сумму полисахаридов 95% этанолом, в объемном соотношении 1:4. Полученную гетерогенную смесь отстаивали в течение 12 ч. Далее осадок

отфильтровывали через воронку Бюхнера и промывали этанолом до обесцвечивания фильтрата. Сумму полисахаридов подвергали депротеинизации по методу Севага, диализовали через полупроницаемую мембрану с размером пор 15 кДа и лиофилизировали, получая сумму полисахаридов из спиртового экстракта – ПССЭ. После отделения ПССЭ из водного остатка, к нему прибавляли ацетон в соотношении 1:8 для осаждения низкомолекулярных соединений и оставляли на 24 ч при температуре 18 °С. Выпавший осадок белого цвета переносили на стеклянный фильтр, промывали ацетоном и высушивали (рисунок 18).



Рисунок 18 – Схема исследования водного остатка экстракта *S. controversa* DC.

0,2 г осадка растворяли в 1 мл воды и наносили на хроматографическую колонку с полиамидом (диаметр 1,2 см, высота слоя сорбента 25 см.), элюируя смесью этанол-вода (5-50%), выделили белое аморфное вещество (180 мг, 45 мг/г экстракта) [94]. По данным CHN анализа молекулярное содержание углерода составляет 45,65%, водорода – 2,17%, содержание

кислорода, вычисленное по разнице составило 52,18%. На спектре ЯМР  $^1\text{H}$  присутствует синглетный сигнал при  $\delta_{\text{H}} - 7,15$  м.д., характерного для протонов ароматической системы. Сигналы в  $^{13}\text{C}$  ЯМР-спектре ( $\delta_{\text{C}}$  180.0 м.д. (C=O); 152.9 м.д., 118.2 м.д. (-C=C-); 160.2 м.д. (-COOH)) характерны для симметричной молекулы. Для определения молекулярного катионного радикала  $m/z$  использовали масс-спектрометрию: 184.0006 ( $\text{M}^+$ ,  $\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_6^+$ ; рассчитано: 184.0002), основные осколочные ионы  $m/z$  139 (-45, ацетил); 69 (-70,  $\gamma$ -пирон).

Таким образом, выделенное вещество имеет следующие физико-химические характеристики: белый аморфный порошок (из  $\text{H}_2\text{O}$ ). Т.пл.  $265^\circ\text{C}$ , УФ спектр (EtOH),  $\lambda$  272 нм; ИК – спектр (KBr,  $\nu$   $\text{cm}^{-1}$ ): 3437 (OH), 3067 ( $\text{CH}_2$ ), 1702 (C=O), 1642 (-C=C-), 1405, 1361(OH), 1123 (C-O), 960, 914, 883, 812, 796, 730, 618, 539, 465; ЯМР  $^1\text{H}$  (600 МГц,  $\text{D}_2\text{O}$ ),  $\delta$  7.02 м.д. (2H, с); ЯМР  $^{13}\text{C}$  (150 МГц, ДМСО- $d_6$ ),  $\delta$  180,0 м.д. (CO), 152,9; 118,2 (C=C), 160,2 (COOH); Масс-спектр  $m/z$ : 184 ( $\text{M}^+$ ), 139, 69; рассчитано для  $\text{C}_7\text{H}_4\text{O}_6$  (184,07): С 45,67; Н 2,19; найдено: С 45,65; Н 2,17. Вещество идентифицировано как 4-оксо-4Н-пиран-2,6-дикарбоновая кислота (хелидоновая кислота, рисунок 19).

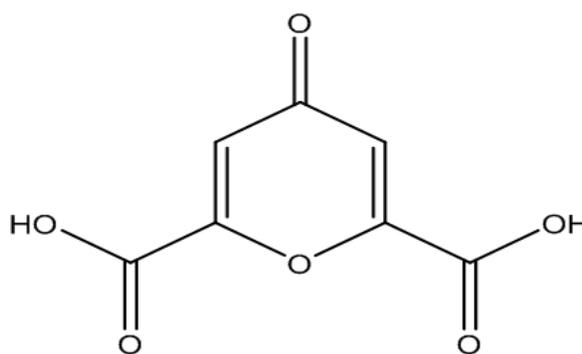


Рисунок 19 – Структурная формула хелидоновой кислоты

Технологический выход ПССЭ составил  $5,35\% \pm 0,62\%$  (в пересчете на сухой экстракт) и  $6,15\% \pm 0,62$  в пересчете на водный остаток. ПССЭ исследовали на содержание белка и уроновых кислот.

Мономерный состав ПССЭ устанавливали после кислотного гидролиза с внутренним стандартом - миоинозитолом (ТФУ, конц. 2 моль/л). После этого из продуктов гидролиза получали ацетаты полиолов и подвергали их анализу методом ГЖХ (рисунок 20).

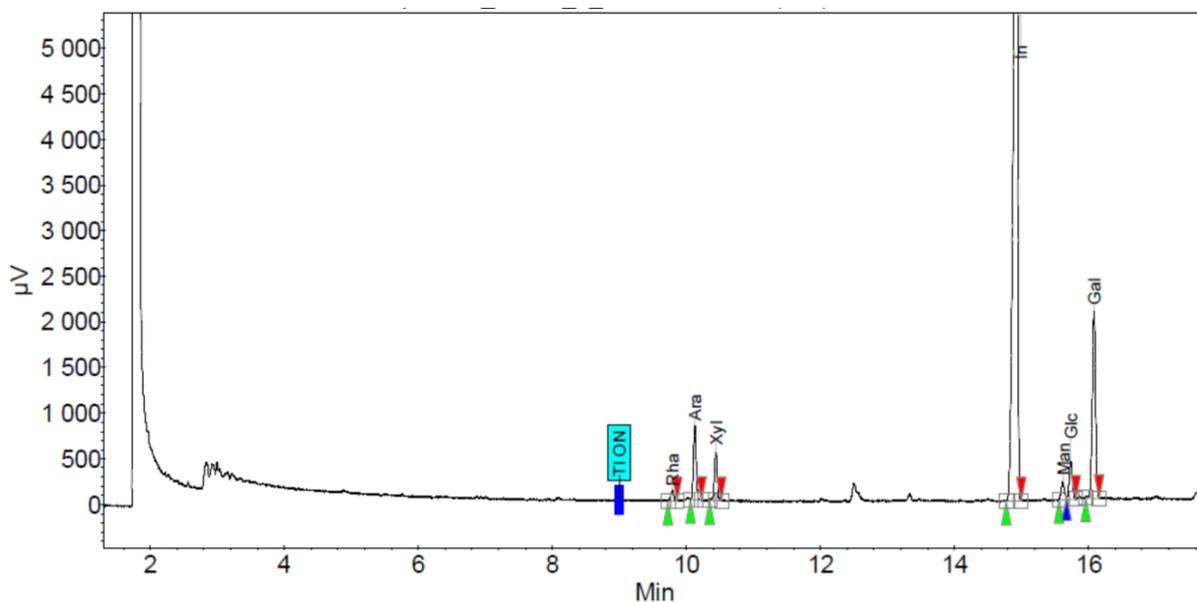


Рисунок 20 – ГЖХ ацетатов полиолов полученных из ПССЭ *S. controversa* DC.

ПССЭ состоит из полисахаридов с различными молекулярными массами. Так, сумма содержит 21 высокомолекулярный полисахарид с молекулярной массой более 5 кДа (от 5,6 до 304,9 кДа). Содержание высокомолекулярных полисахаридов составляет 65,9% от фракции ПССЭ. Кроме того, ПССЭ содержит 9 соединений с молекулярной массой ниже 5 кДа (от 0,9 до 4,8 кДа). Содержание низкомолекулярных полисахаридов составило 34,1% от фракции ПССЭ. Содержание белка в ПССЭ составило  $16,15 \pm 0,48\%$ . Средневесовая молекулярная масса ( $M_w$ ) ПССЭ составила 108,6, а среднечисленная молекулярная масса ( $M_n$ ) - 5,5 кДа. ПССЭ характеризуются высокой степенью гетерогенности, индекс гетерогенности составил 19,74. Доминирующими монозами ПССЭ, определенных методом ГЖХ, являются галактоза (40,53%) и арабиноза (13,16%). Остатки ксилозы (8,95%), глюкозы (8,55%), маннозы (3,65%) и рамнозы (2,16%) являются

второстепенными компонентами углеводных цепей ПССЭ. Содержание уроновых кислот составило  $6,71 \pm 0,25\%$ . Таким образом, ПССЭ структурно можно отнести к арабиногалактану с  $M_w$  108,6 кДа и сложным мономерным составом.

### Выводы к главе 3

1. Листья *S. controversa* DC. содержат сесквитерпеновые лактоны, сапонины, дубильные вещества, кумарины, флавоноиды ( $1,20\% \pm 0,05\%$ ), фенолкарбоновые кислоты ( $4,46\% \pm 0,76\%$ ), эфирное масло ( $0,51\% \pm 0,07\%$ ), полисахариды, аминокислоты, макро- и микроэлементы.

2. Впервые охарактеризованы полисахаридные комплексы водного извлечения и экстракта на 40% этаноле *S. controversa* DC. по молекулярно-массовому распределению, содержанию белка, количественному соотношению и мономерному составу нейтральных и кислых сахаров. Технологический выход фракций ПС составил: ФПС<sub>1</sub> ( $1,93\% \pm 0,35\%$ ); ФПС<sub>2</sub> ( $0,74\% \pm 0,16\%$ ); ФПВ ( $10,52\% \pm 1,58\%$ ) и из экстракта на 40% этаноле: ПССЭ ( $6,15 \pm 0,62\%$ ). Основными структурными мономерами ФПС<sub>1</sub>, ФПС<sub>2</sub> и ПССЭ являются галактоза и арабиноза, а  $\Sigma$ ПВ – галактуроновая кислота.

3. Хроматографическими методами (БХ, ТСХ, ВЭЖХ) впервые для данного вида идентифицированы фенолкарбоновые кислоты (коричная, кофейная, хлорогеновая, галловая, хинная, салициловая), аминокислоты (валин, аргинин, треонин, лизин, глицин), флавоноиды (кверцетин, рутин, кемпферол, дигидрокверцетин), кумарины (умбеллиферон, эскулетин), тритерпеновые сапонины (олеаноловая и урсоловая кислоты).

4. Выделены макрокомпоненты экстракта *S. controversa*: полисахариды, гликозиды кверцетина (7-О- $\alpha$ -L-рамнозид-3-О- $\beta$ -D-глюкозид кверцетина, 3-О- $\beta$ -D-диглюкозид-О- $\alpha$ -L-рамнозид кверцетина, рутин), хелидоновая кислота, перспективные для дальнейшего изучения их биологической активности, а также для стандартизации сырья *S. controversa* DC.

## ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСТРАКТА ЛИСТЬЕВ *S. CONTROVERSA* DC. НА 40% ЭТАНОЛЕ И ЕГО КОМПОНЕНТОВ

### 4.1. Исследование острой токсичности

Для первичной оценки безопасности сухого экстракта исследовали его острую токсичность. Экспериментальных животных (раздел 2.8.1.) распределяли на четыре группы: 1) интактные животные; 2) животные, получавшие экстракт в дозе 2000 мг/кг (рекомендуемая пороговая доза для предварительной оценки безопасности при внутрижелудочном введении по классификации Ходжа и Стернера для веществ малотоксичных); 3) животные, получавшие экстракт в дозе 5000 мг/кг (для оценки класса опасности согласно ГОСТ 12.1.007-76); 4) животные, получавшие экстракт в дозе 10000 мг/кг (для определения LD<sub>50</sub>) (группа 4). Экстракт вводили в виде водной суспензии в желудок. Интактным животным вводили воду очищенную в эквивалентном количестве. Для достижения указанных доз введение осуществляли повторно с интервалом в 20-30 мин. (таблица 23).

Таблица 23 – Нервно-соматические показатели и весовые коэффициенты (ВК) органов крыс после введения сухого экстракта сосюреи спорной ( $X \pm x$ , n = 10)

Определяемые параметры	Группы животных			
	1	2	3	4
	Интактные	2000 мг/кг	5000 мг/кг	10000 мг/кг
Масса тела, г (до введения /через 2 недели)	336±32/ 346±34	327±15/ 305±23	300±24/ 290±34	293±29/ 292±20
Частота дыхания / мин (через 1 ч)	132±10	128±12	112±12	92±6*
Частота сердечных сокращений / мин (через 1 ч)	252±10	244±16	228±10	232±12
Количество перемещений в открытом поле / мин	37±3/ 32±5	27±8/ 22±5	32±20/ 18±13	39±8/ 39±10

(через 3 ч / 24 ч)				
Потребление воды мл/крысу (1 сутки / 2 / 3)	25/33/52	32/48/73	27/15/50	28/33/75
Потребление корма г/крысу (1 и 2 сутки / 3 и 4)	34/32	33/36	30/28	33/30
Реакция на раздражители (в течение 3 ч / 24 ч)	- / -	- / -	- / -	+ / +
Птоз (в течение 3 ч)	-	-	-	+
ВК сердца	0,0038 ± 0,0005	0,0035 ± 0,0005	0,0033 ± 0,0002	0,0039 ± 0,0003
ВК печени	0,0389 ± 0,0013	0,0376 ± 0,0034	0,0338 ± 0,0028	0,0375 ± 0,0042
ВК селезенки	0,0044 ± 0,0006	0,0047 ± 0,0014	0,0060 ± 0,0028*	0,0063 ± 0,0016*
ВК почек	0,0078 ± 0,0004	0,0080 ± 0,0010	0,0075 ± 0,0007	0,0079 ± 0,0007

Примечание: «-» - явления не наблюдали; «+» - явление наблюдали.

\* - различия достоверны в сравнении с группой 1;  $p \leq 0,05$ .

В группе крыс, получавших дозу 2000 мг/кг (группа 2) после введения экстракта наблюдали снижение подвижности по сравнению с интактными животными в течение суток, однако, животные мало отличались от интактных. У животных 3 и 4 группы в течение первых пяти часов после введения экстракта наблюдали клиническую картину интоксикации, отмечались заторможенность, вялость, птоз, брадикардия. В группе 4 наблюдали яркую реакцию на раздражители (звуковые и тактильные) в течение суток после введения экстракта. Через 24 часа у животных 3 и 4 групп появилось слезотечение, симптомы конъюнктивита, которые сохранялись в течение 4-х и 8-ми суток соответственно. Достоверных различий в динамике массы тела, частоты сердечных сокращений, потреблении воды и корма в группах интактных животных и получавших экстракт, не выявили.

Значительных различий в гемограмме интактных животных и группы 2 не наблюдалось (таблица 24).

Таблица 24 – Данные анализов крови после введения сухого экстракта сосюреи спорной ( $X \pm x$ ,  $n = 10$ , ед. изм. =  $1 \times 10^9/\text{л}$ )

Определяемые параметры	Группы животных			
	1	2	3	4
	Интактные	2000 мг/кг	5000 мг/кг	10000 мг/кг
Эритроциты	7,69 ± 0,53	7,10 ± 1,30	7,87 ± 0,56	5,81 ± 1,25
Средний объем эритроцита	53,05 ± 0,70	56,44 ± 2,52	53,05 ± 1,25	63,52 ± 7,01*
Распределение эритроцитов	12,37 ± 1,16	13,88 ± 2,97	12,23 ± 1,38	18,74 ± 3,12*
Лейкоциты	10,51 ± 1,93	9,46 ± 3,54	13,12 ± 2,40	18,10 ± 4,21*
Лимфоциты	6,90 ± 1,69	6,12 ± 2,89	8,67 ± 1,80	13,15 ± 1,33*
Гранулоциты	3,23 ± 0,39	3,08 ± 0,75	3,92 ± 0,67	5,40 ± 0,65*
Моноциты	0,38 ± 0,07	0,26 ± 0,09	0,52 ± 0,09	1,07 ± 0,56*
Гемоглобин	135,00 ± 8,90	133,8 ± 23,69	135,75 ± 8,84	112,00 ± 12,35
Среднее содержание гемоглобина в эритроците	17,50 ± 0,37	18,78 ± 0,89	17,18 ± 0,38	19,64 ± 2,50
Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах	330,67 ± 4,13	334,00 ± 3,53	325,00 ± 7,74	309,40 ± 13,35
Гематокрит	40,77 ± 2,70	39,98 ± 6,72	41,67 ± 1,95	36,2 ± 4,29
Тромбоциты	912,33 ± 188,27	825,40 ± 238,83	387,67 ± 214,08*	406,50 ± 83,00*
Тромбокрит	0,550 ± 0,12	0,510 ± 0,12	0,25 ± 0,13	0,28 ± 0,06
Средний объем тромбоцита	6,31 ± 0,22	6,26 ± 0,40	6,35 ± 0,41	6,56 ± 0,58
Распределение тромбоцитов	16,02 ± 0,44	16,18 ± 0,34	16,77 ± 0,61	16,94 ± 0,84

Примечание: \* - различия достоверны в сравнении с группой 1.

В группе 4 наблюдалась тенденция к увеличению количества лейкоцитов, моноцитов и лимфоцитов. В группах 3 и 4 достоверно в два раза уменьшалось количество тромбоцитов. При макроскопическом осмотре органов у крыс группы 4 наблюдали бугристость на селезенке, весовой коэффициент этого органа так же был увеличен по сравнению с интактными животными. В остальных группах весовые коэффициенты основных органов опытных животных, а так же их макроскопические особенности не отличались от интактных. Осложнений и гибели животных не наблюдали.

Таким образом, результаты токсикометрии и данные наблюдений за экспериментальными животными на протяжении 14 дней после введения препарата в исследуемых дозах, а также данные некропсии, позволяют отнести сухой экстракт сосюреи спорной на 40% этаноле к малотоксичным веществам по классификации Ходжа и Стернера. Руководствуясь принятым ГОСТом (12.1.007-76), исследуемый экстракт относится к IV классу опасности – вещества малоопасные.

#### **4.2.Изучение остеогенной активности**

Исследованию на остеогенную активность подвергли сумму флавоноидов (осадок из бутанольной фракции - ОБФ), полисахариды (ПССЭ), а также хелидоновую кислоту полученные из экстракта листьев *S. controversa* DC. на 40% этаноле.

Для этого оценивали влияние вышеуказанных веществ на остеогенную дифференцировку и минерализацию клеточного матрикса мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека (ММСК) (таблица 24) после окраски ализариновым красным. Для всех соединений наблюдали увеличение интенсивности красного окрашивания и количества окрашенных участков, что указывает на дифференцировку ММСК в остеобласты с вовлечением депонированных солей кальция в межклеточном матричном пространстве. При добавлении небольшой концентрации веществ (10 мг/л), было отмечено, что клетки меняли форму за счет уменьшения длины и количества отростков. Единичные очаги кальцификации появлялись в межклеточном матриксе, который был интенсивно окрашен ализарином в красный цвет, что указывает на остеогенную дифференцировку отдельных стволовых клеток. В случае увеличения концентрации введенных веществ (30 и 50 мг/л), наблюдали увеличение отдельных очагов минерализации, а также интенсивно окрашенные многослойные волокнистые структуры. Образование данных структур является результатом слияния отдельных участков минерализации и свидетельствует о значительном увеличении

остеобластической дифференцировки в культуре ММСК под влиянием изучаемых соединений.

ПССЭ дозозависимо увеличивали количество (до 9 раз) окрашенных ализарином красных участков в культуре клеток. Средние площади участков минерализации соответствовали контрольному уровню (таблица 25).

Таблица 25 – Влияние мажорных компонентов *S. controversa* DC. на остеогенную дифференцировку ММСК *in vitro*

№ п/п	Группа, n=3	Дозировка мг/л	Число участков минерализации клеточной культуры, мм <sup>2</sup>	Средняя площадь участков минерализации, мм <sup>2</sup>	U критерий статистической значимости
1.	Контроль	0	14 ± 2	0,027 (0,013-0,095)	-
2.	Клетки + сумма флавоноидов (ОБФ)	10	16 ± 5	0,039 (0,019-0,093)	U <sub>1</sub> < 0.05
		30	21 ± 4	0,029 (0,007-0,051)	U <sub>1</sub> < 0.05
		50	53 ± 3	0,048 (0,020-0,083)	U <sub>1</sub> < 0.05
3.	Клетки + сумма полисахаридов (ПССЭ)	10	47 ± 3	0,037 (0,011-0,179)	U <sub>1</sub> < 0.05 U <sub>3</sub> < 0.05
		30	118 ± 5	0,025 (0,009-0,090)	U <sub>1</sub> < 0.05 U <sub>3</sub> < 0.05
		50	128 ± 13	0,018 (0,009-0,064)	U <sub>1</sub> < 0.05 U <sub>3</sub> < 0.05
4.	Клетки + хелидоновая кислота	10	13 ± 2	0,033 (0,009-0,053)	U <sub>1</sub> < 0.05
		30	31 ± 3	0,043 (0,018-0,121)	U <sub>1</sub> < 0.05
		50	56 ± 4	0,060 (0,024-0,096)	U <sub>2</sub> < 0.05

Примечание: статистическая значимость показана по критерию Манна–Уитни (U): U<sub>1</sub> – с контролем; U<sub>2</sub> – с дозами 30 и/или 10 мг/л; U<sub>3</sub> – с соответствующей дозой другого вещества; n- количество испытанных лунок культуральной пластины для каждой дозировки; контроль – интактные культивируемые стволовые клетки.

В ходе эксперимента происходила стимуляция трехмерных локусов с преобладанием дифференцировки ММСК в остеобласты без массивной клеточной пролиферации. Остеогенная активность ПССЭ достоверно превышала аналогичную у суммы флавоноидов (ОБФ) и хелидоновой кислоты. Флавоноиды и хелидоновая кислота в дозе 10 мг/л не способствовали дифференцировке клеток в остеобласты, так как область окраски с ализариновым красным в местах минерализации межклеточного матрикса достоверно не отличалась от контроля, но с увеличением дозы флавоноидов и хелидоновой кислоты до 30 и 50 мг/л число участков кальцификации ММСК увеличивалось в 3,5-4 раза (рисунок 21).

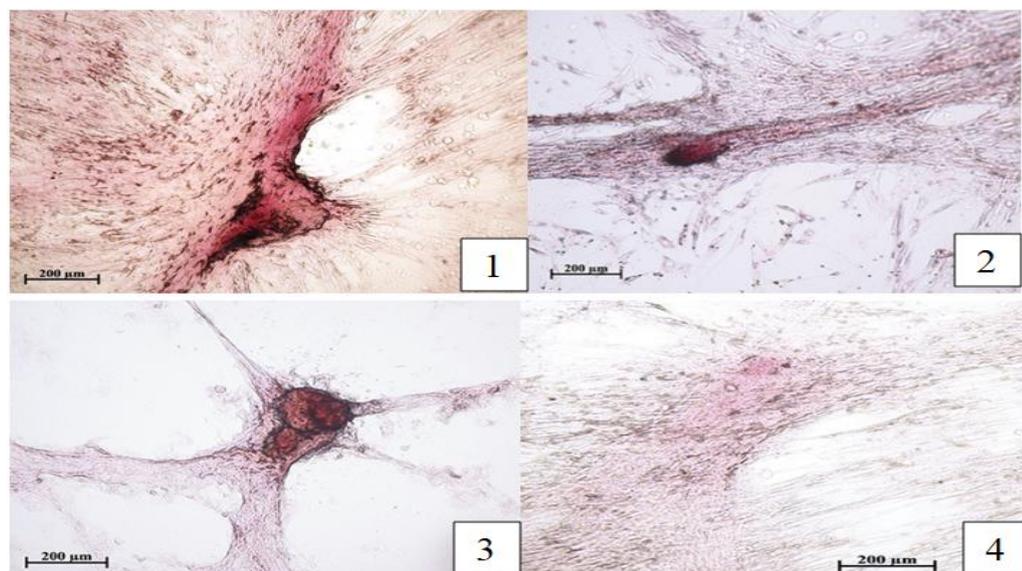


Рисунок 21 – Культура клеток ММСК, после культивирования в течение 21 дня с добавлением: 1) хелидоновой кислоты; 2) суммы флавоноидов (ОБФ); 3) суммы полисахаридов (ПССЭ); 4) интактные (контроль)

Сравнительную остеогенную активность оценивали, рассчитывая общую площадь участков кальцификации. Как видно из рисунка 22, площади кальцификации клеточной культуры составили 2,581 мм<sup>2</sup> для хелидоновой кислоты; 4,368 мм<sup>2</sup> для суммы флавоноидов (ОБФ); 4,901 мм<sup>2</sup> для суммы полисахаридов (ПССЭ).

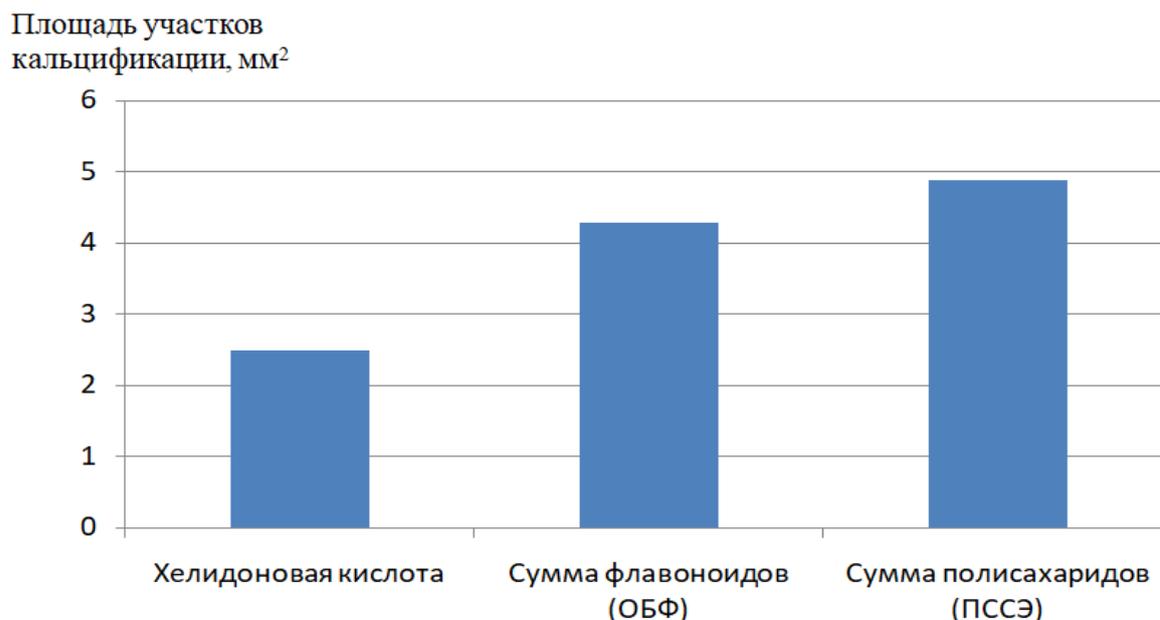


Рисунок 22 – Остеогенная активность мажорных компонентов *S. controversa* DC. в дозе 30 мг/л.

Таким образом, остеогенную активность исследуемых веществ на ММСК оценивали по двум критериям: 1) числу участков минерализации клеточной культуры, окрашенных ализарином (остеобласты) и 2) общей площади участков кальцификации. Соответственно, степень влияния объектов на дифференцировку ММСК в остеобласты формирует следующий ряд активности: хелидоновая кислота  $\leq$  сумма флавоноидов (ОБФ) < сумма полисахаридов (ПССЭ). Из этого следует, что хелидоновая кислота, флавоноиды и ПССЭ являются перспективными агентами для ускорения регенерации костной ткани [130].

#### 4.3. Исследование иммуотропной активности

Фенольные соединения и полисахариды способны изменять основные функции макрофагов: усиливать фагоцитарную активность, продукцию активных форм кислорода и оксида азота (NO). В свою очередь, оксид азота играет важную роль в регуляции функций различных систем организма, участвует в развитии адаптивных иммунных реакций, ингибирует репликацию патогенов, регламентирует апоптоз и пролиферацию клеток,

включая макрофаги, Т-лимфоциты, тучные клетки, нейтрофилы и лимфоциты [45, 125, 160].

Результаты исследования NO-синтазной активности исследуемых БАВ экстракта *S. controversa* DC. на 40% этаноле представлены в таблице 26.

Таблица 26 – NO – стимулирующая активность целевых БАВ экстракта *S. controversa* DC.

Исследуемое вещество	Концентрация нитритов (мкМ)
Контроль 1 (макрофаги + среда)	2,00 ± 0,05
ЛПС (0,1 мкг/мл)	18,97 ± 0,62*
МДП (30 мкг/мл)	3,27 ± 0,15* <sup>■</sup>
Кверцетин-7-О-β-D-глюкопиранозил-3-О-α-L-рамнопиранозид (БФ-1) (20 мкг/мл)	3,23 ± 0,26 <sup>■</sup>
Кверцетин-3-О-β-D-диглюкопиранозил-О-α-L-рамнопиранозид (БФ-2) (20 мкг/мл)	2,64 ± 1,12 <sup>■</sup>
Кверцетин-3-О-β-D-глюкопиранозил-О-α-L-рамно-пиранозид (БФ-3) (20 мкг/мл)	2,60 ± 0,10 <sup>■</sup>
Хелидоновая кислота(20 мкг/мл)	8,17 ± 0,26* <sup>■</sup>
Полисахариды из экстракта на 40% этаноле (ПССЭ) (20 мкг/мл)	15,76 ± 0,43* <sup>■</sup>

Примечание. \*– различия показателя с контролем 1 достоверны,  $p < 0,05$

<sup>■</sup>– различия показателя с ЛПС достоверны,  $p < 0,05$ ;  $n=5$

Как видно из таблицы 26, степень влияния выделенных БАВ на NO-синтазную активность существенно различается. Наибольшую активность сопоставимую с липополисахаридом проявили ПССЭ. По величине активности можно расположить БАВ в следующий ряд: ПССЭ > хелидоновая кислота > кверцетин-7-О-β-D-глюкопиранозил-3-О-α-L-рамнопиранозид > кверцетин-3-О-β-D-диглюкопиранозил-О-α-L-рамнопиранозид > рутин.

Таким образом, посредством увеличения NO-синтазной активности макрофагов фракции ПССЭ и хелидоновая кислота проявляют иммуностропную активность.

#### Выводы к главе 4

1. Исследование острой токсичности экстракта на 40% этаноле *S. controversa* DC. позволило отнести его к IV классу опасности – малоопасным веществам.

2. По величине остеогенной активности мажорные компоненты экстракта на 40% этаноле *S. controversa* DC. распределяются следующим образом: ПССЭ > сумма флавоноидов (ОБФ) > хелидоновая кислота.

3. По величине стимулирования NO-синтазной активности макрофагов выделенные БАВ формируют следующий ряд: ПССЭ > хелидоновая кислота > кверцетин-7-O-β-D-глюкопиранозил-3-O-α-L-рамнопиранозид > кверцетин-3-O-β-D-диглюкопиранозил-O-α-L-рамнопиранозид > рутин.

4. ПССЭ, хелидоновая кислота и флавоноиды являются перспективными целевыми БАВ для последующей стандартизации растительного сырья *S. controversa* DC.

## ГЛАВА 5. РАЗРАБОТКА МЕТОДИК СТАНДАРТИЗАЦИИ ЛИСТЬЕВ СОСЮРЕИ СПОРНОЙ

Введение в широкую практику новых видов сырья требует разработки различных видов нормативной документации (фармакопейных статей, ТУ, ОСТ, ГОСТ), в которых установлены требования к качеству и безопасности. В связи с этим следующий этап нашего исследования посвящен разработке нормативной документации, включающий определение подлинности сырья по морфологическим, анатомическим признакам, качественным реакциям, определение качества сырья по товароведческим показателям и количественному содержанию основных действующих веществ.

### 5.1. Морфолого-анатомическое исследование листьев *S. controversa* DC.

Ввиду особенностей габитуса, в частности, преобладания виргинильных – розеточных, бесстебельных особей, к заготовке в качестве сырья предлагаются листья с. спорной – *folia S. controversa* DC.

Описание. *Цельное сырье.* Смесь цельных или частично измельченных простых черешковых и сидячих листьев. Листья яйцевидные либо продолговато – яйцевидные длинночерешковые, длиной от 8 до 12 см, шириной от 2,5 до 9 см, широкие, основание глубокосердцевидное, край неравнозубчатый. Верхние листья – сидячие, удлинено - ланцетовидной формы, тупые при основании. Жилкование сетчатое, нижние стороны всех листьев густоопушены, опушение беловойлочное. Цвет листьев с верхней стороны от светло-зеленого до темно-зеленого, с нижней – серовато-белый.

Черешки листьев зеленые длиной от 3 до 10 см, в сечении имеют треугольную форму. Запах специфический. Вкус водного извлечения горький.

*Измельченное сырье.* Смесь кусочков листьев и черешков, и их рыхлые агрегаты, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 6 мм.

Цвет измельченного сырья от светло-зеленого до темно-зеленого. Запах специфический, вкус водного извлечения горький.

Анатомическое строение листа *S. controversa* DC. свидетельствует о процессах ксерофитизации. Листья гипостоматические, дорсовентральные, с нижней стороны густо опушены кроющими волосками. Внешние стенки клеток адаксиального эпидермиса листа многоугольные, неравномерно утолщены, имеют вытянутую, округлую, зигзагообразную форму и покрыты толстым слоем морщинистой кутикулы (рисунки 23, 24). Мезофилл однорядный хорошо выражен, представлен палисадным и 5-6-рядным губчатым мезофиллом, при этом в губчатом мезофилле имеются хорошо выраженные межклетники (рисунок 24).

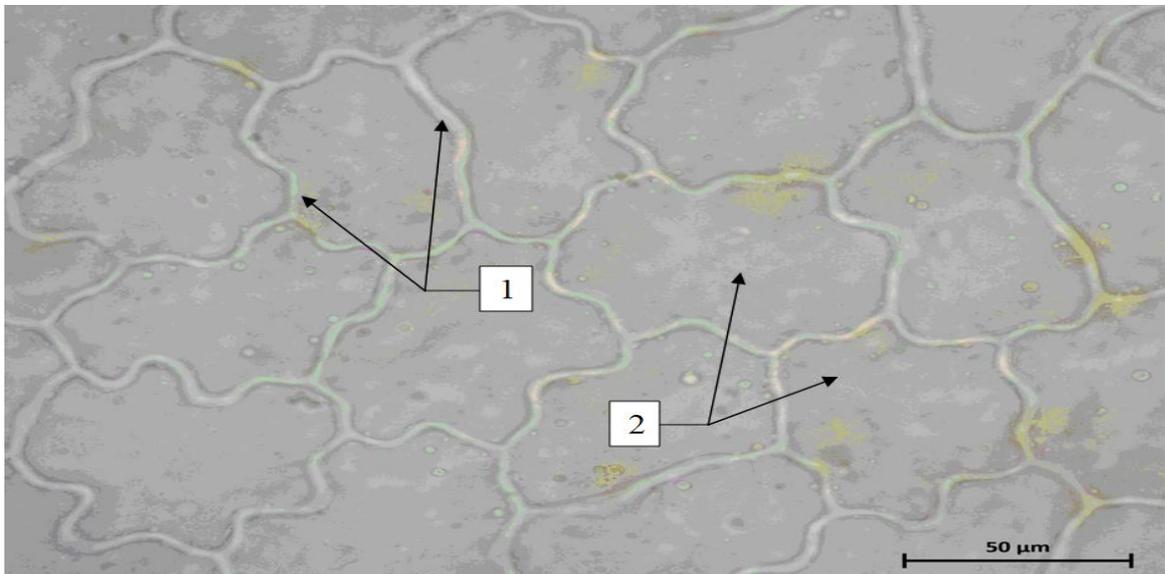


Рисунок 23 – Фрагмент плоскостного препарата листа (верхний эпидермис, ув.х20): 1 – зигзагообразные клетки с неравномерными утолщенными клетками, 2 – многоугольные клетки эпидермиса

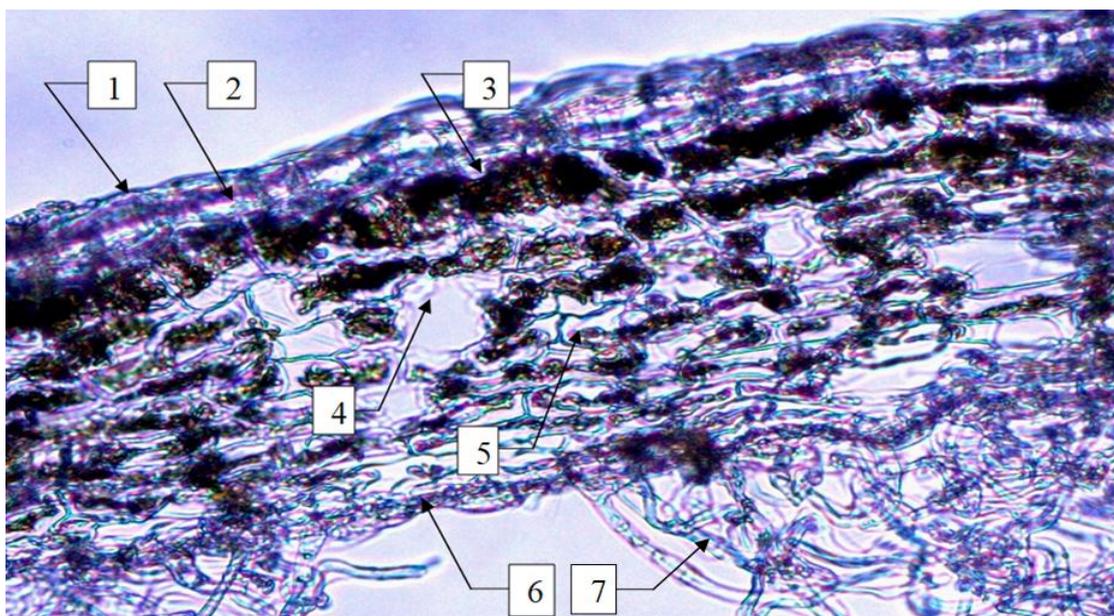


Рисунок 24 – Фрагмент поперечного среза листа (ув.х10): 1 – кутикула, 2 – адаксиальный эпидермис, 3 – палисадный мезофилл, 4 – межклетник, 5 – губчатый мезофилл, 6 – абаксиальный эпидермис, 7 – кроющие волоски.

Нижний эпидермис листа состоит из треугольных, четырехугольных и многоугольных клеток с сильноизвилистыми, зигзагообразными тонкими стенками. Устьица окружены 4-6 околоустьичными клетками - аномоцитный тип и располагаются на поверхности, кроме того, встречаются погруженные в эпидермис (рисунок 25). Хорошо известно, что в отдельных случаях для более достоверной идентификации видов в систематике наряду с анатомическими признаками используют стоматографические, под которыми понимается устьичный индекс, являющийся видоспецифичным. Под устьичным индексом понимают отношение количества устьиц к количеству эпидермальных клеток на единицу площади [76], его определение для соснуреи спорной проводили по методике Европейской Фармакопеи [113].

Устьичный индекс ( $U_i$ ) рассчитывали по формуле:

$$U_i = N_u \times 100\% / (N_{не} + N_u),$$

где  $N_u$  – число устьиц на единице площади,  $N_{не}$  – число основных клеток нижней эпидермы на единице площади.

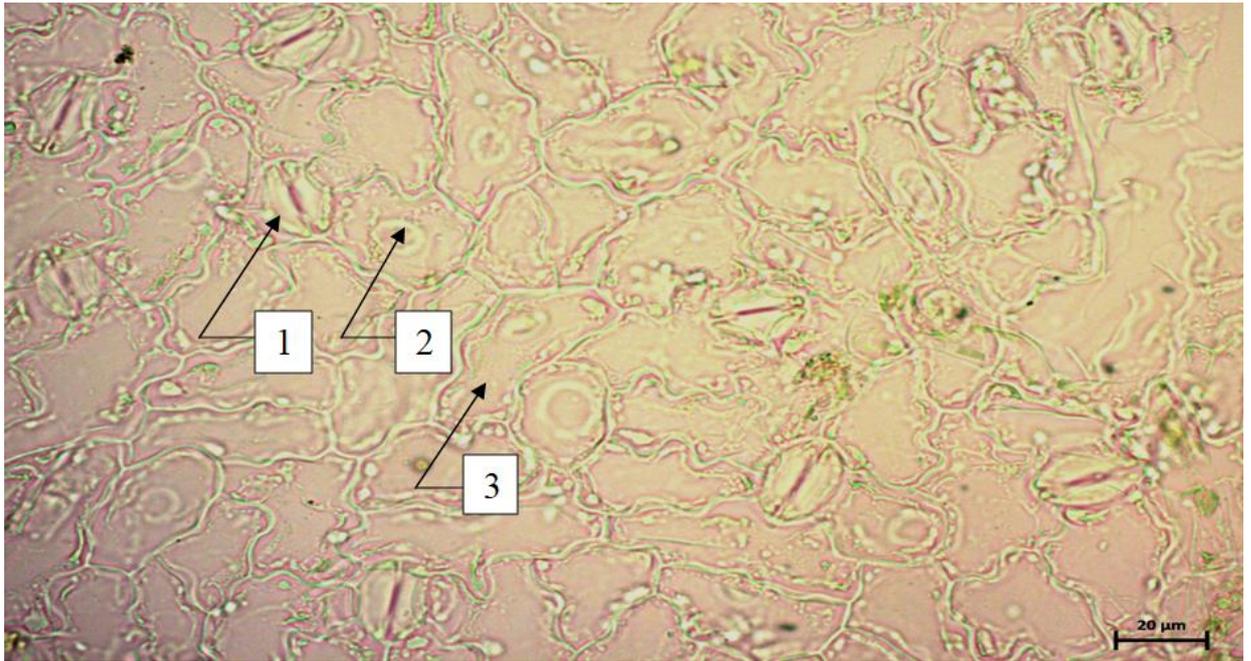


Рисунок 25 – Фрагмент плоскостного препарата листа (нижний эпидермис, ув.х40): 1 – устьице, 2 – околоустьичные клетки, 3 – эпидермальные клетки.

Клетки нижнего эпидермиса в 3-4 раза меньше клеток верхнего эпидермиса (рисунок 26). На нижнем эпидермисе присутствуют устьица двух форм: преимущественно вытянутые, в меньшей степени встречаются округлые. Размер устьиц: средняя длина  $24,8 \pm 2,3$  мкм; средняя ширина  $18,1 \pm 2,9$  мкм. Устьичный индекс составил  $25,8 \pm 0,6\%$ .

На эпидермисе нижней стороны листа представлено беловойлочное опушение с присутствием волосков трех типов. 1 тип - двух-трехклеточные головчатые волоски (рисунок 27);

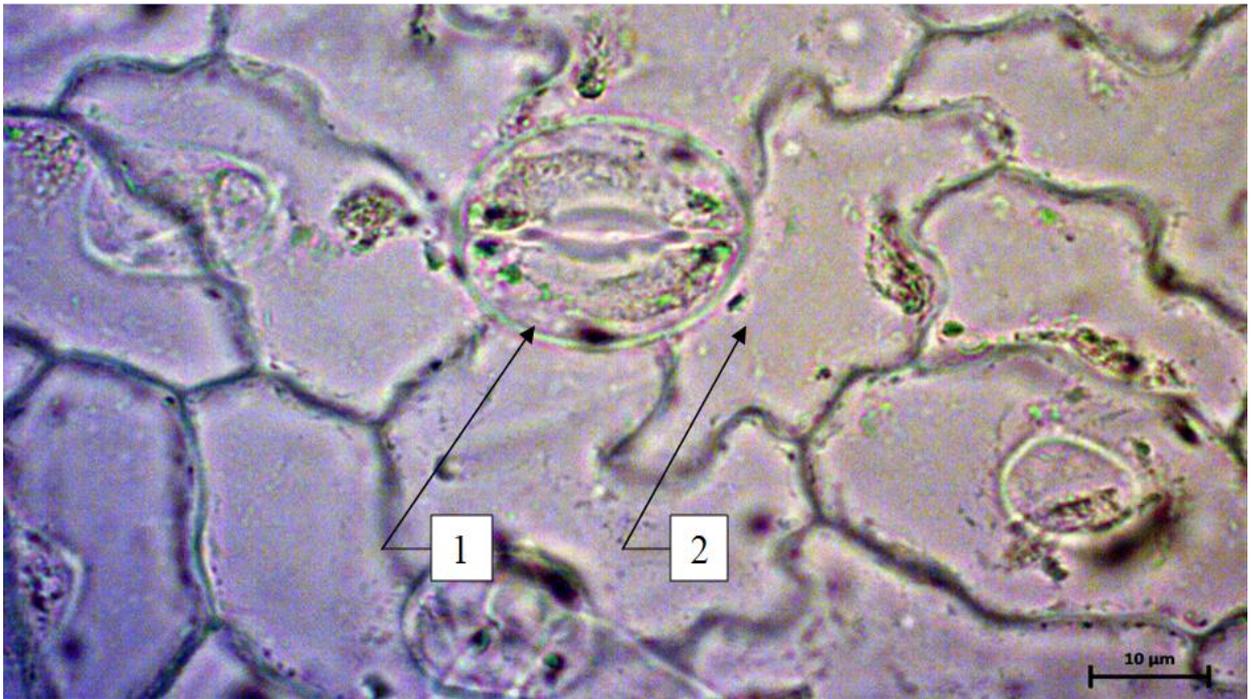


Рисунок 26 – Фрагмент плоскостного препарата листа (нижний эпидермис, ув.х60): 1 – устьице, 2 – околоустьичные клетки.



Рисунок 27 – Фрагмент плоскостного препарата листа (нижний эпидермис, ув.х100): 1 – трехклеточный головчатый волосок, 2 – устьице.

Второй тип - длинные 2-3 клеточные, бичевидные, состоящие из двух маленьких клеток бочонковидной или пьедестальной формы в основании и

третьей основной длиной. Эти волоски составляют основную массу опушения на нижнем эпидермисе (рисунки 28, 29, 30).

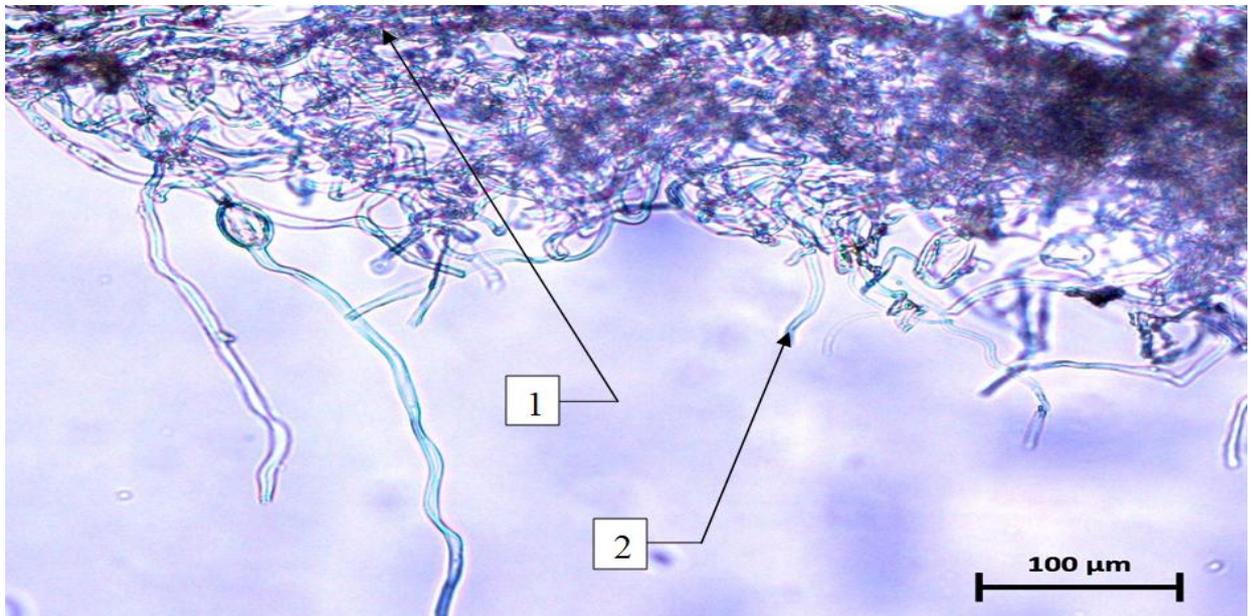


Рисунок 28– Фрагмент поперечного среза листа с кроющими волосками (ув.х10): 1 – нижний эпидермис, 2 – трехклеточные бичевидные волоски

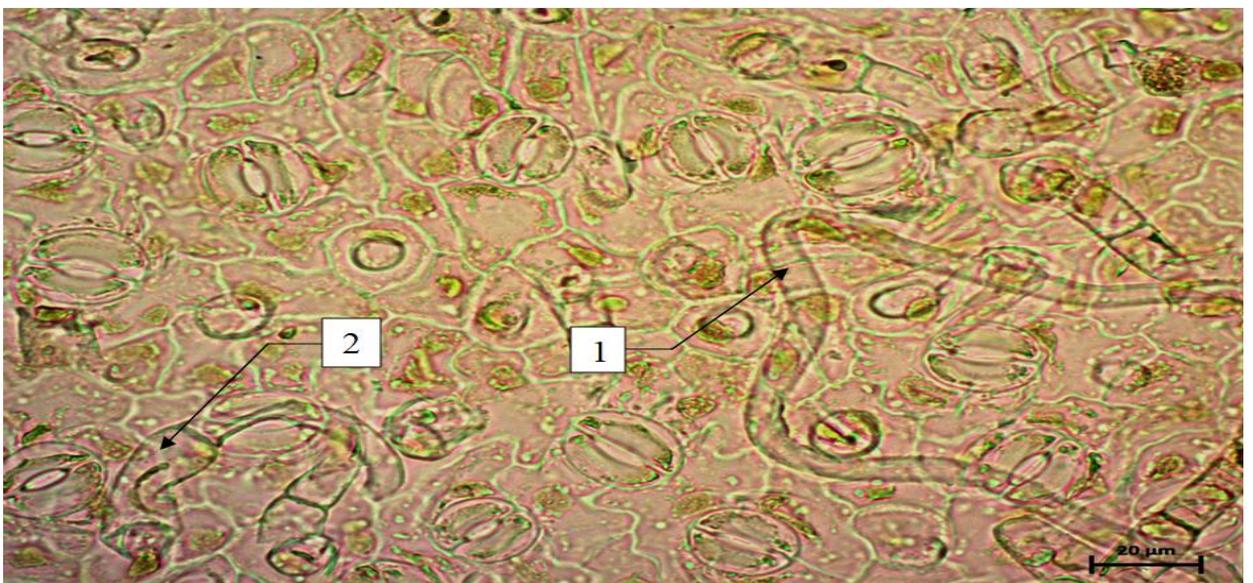


Рисунок 29 – Фрагмент плоскостного препарата листа (нижний эпидермис, ув.х40): 1 – трехклеточный бичевидный волосок, 2 – пьедестальная клетка в основании фрагмента бичевидного волоска.

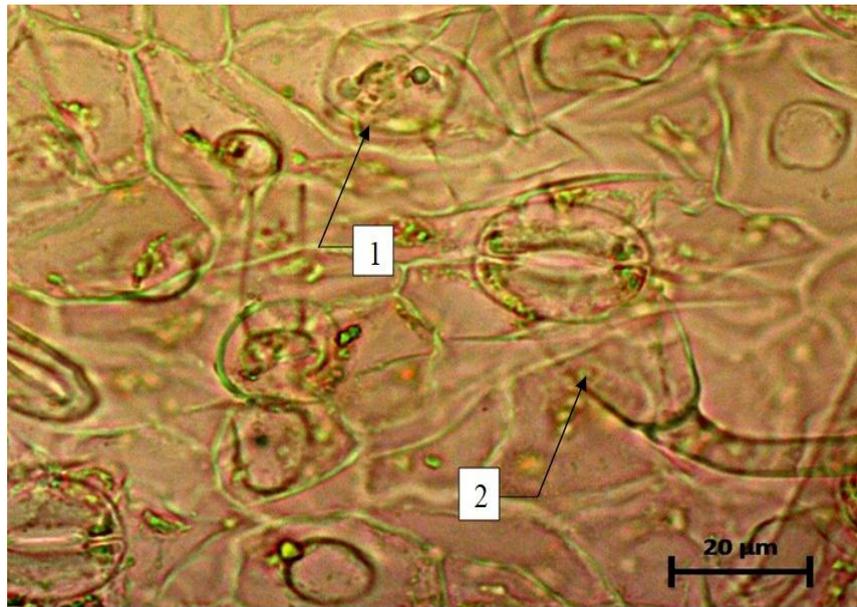


Рисунок 30 – Фрагмент плоскостного препарата листа (нижний эпидермис, ув.х100): 1 – двухклеточный головчатый волосок, 2 – пьедестальная клетка в основании фрагмента бичевидного волоска.

Третий тип – четырехклеточные волоски, с тремя округлыми бочонковидными клетками в основании и одной верхушечной длинной бичевидной клетки (рисунок 31).

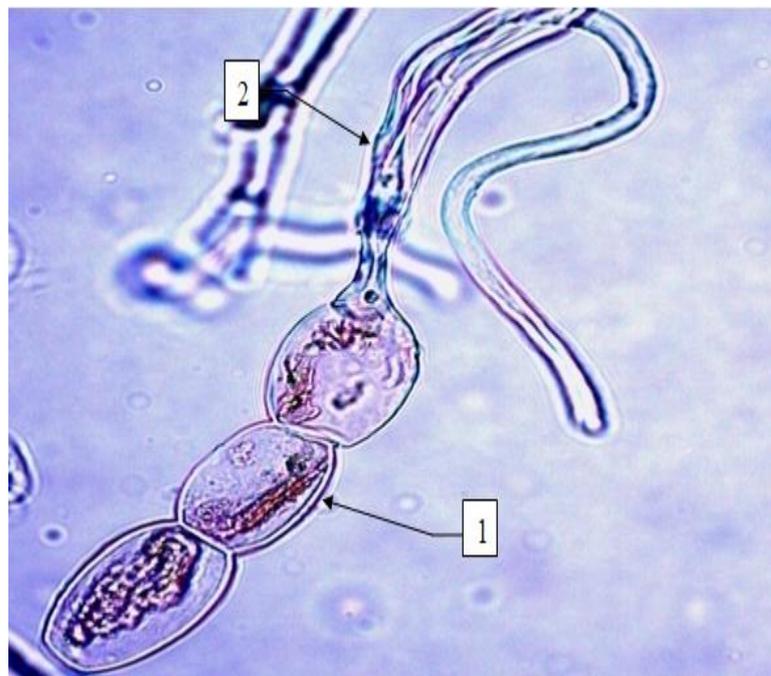


Рисунок 31 – Фрагмент препарата волоска (нижний эпидермис, ув.х40): 1 – округлые бочонковидные клетки, 2 – бичевидная клетка.

На препарате поперечного среза центральной жилки листа, выявлены 5-7 коллатеральных проводящих пучков открытого типа. С верхней и нижней стороны пучков, присутствуют хорошо выраженные тяжи склеренхимы. Главная жилка листа по нижней стороне усилена колленхимой (рисунок 32).

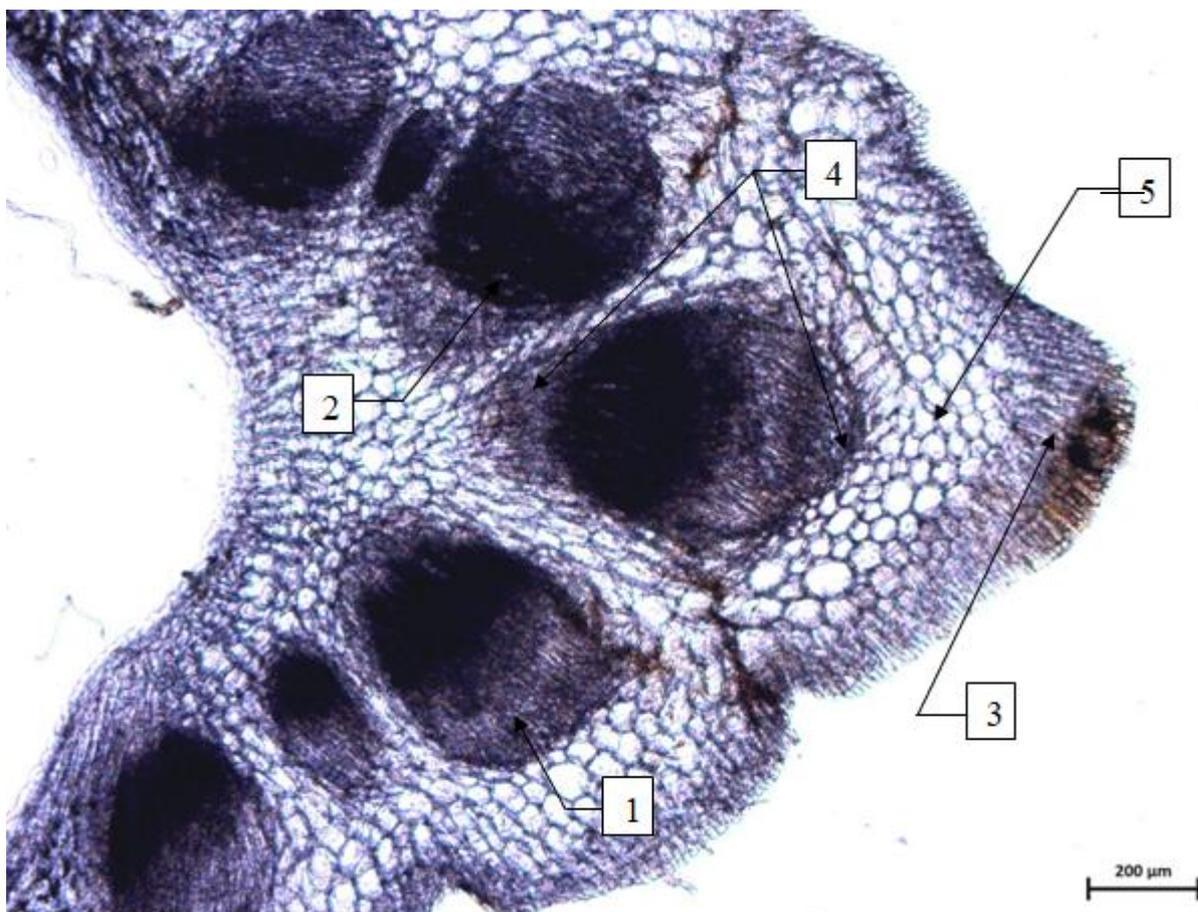


Рисунок 32 – Фрагмент поперечного среза центральной жилки листа (ув. х10): 1 – ксилема, 2 – флоэма, 3 – колленхима, 4 – склеренхима, 5 – паренхима.

На препарате поперечного среза черешка также присутствуют коллатеральные пучки, количество которых составляет от 10 до 14. С двух сторон от центрального пучка, симметрично расположены по одному пучку, втрое меньшего размера. Пучки срединной части черешка имеют размер аналогичный центральному (рисунок 33).

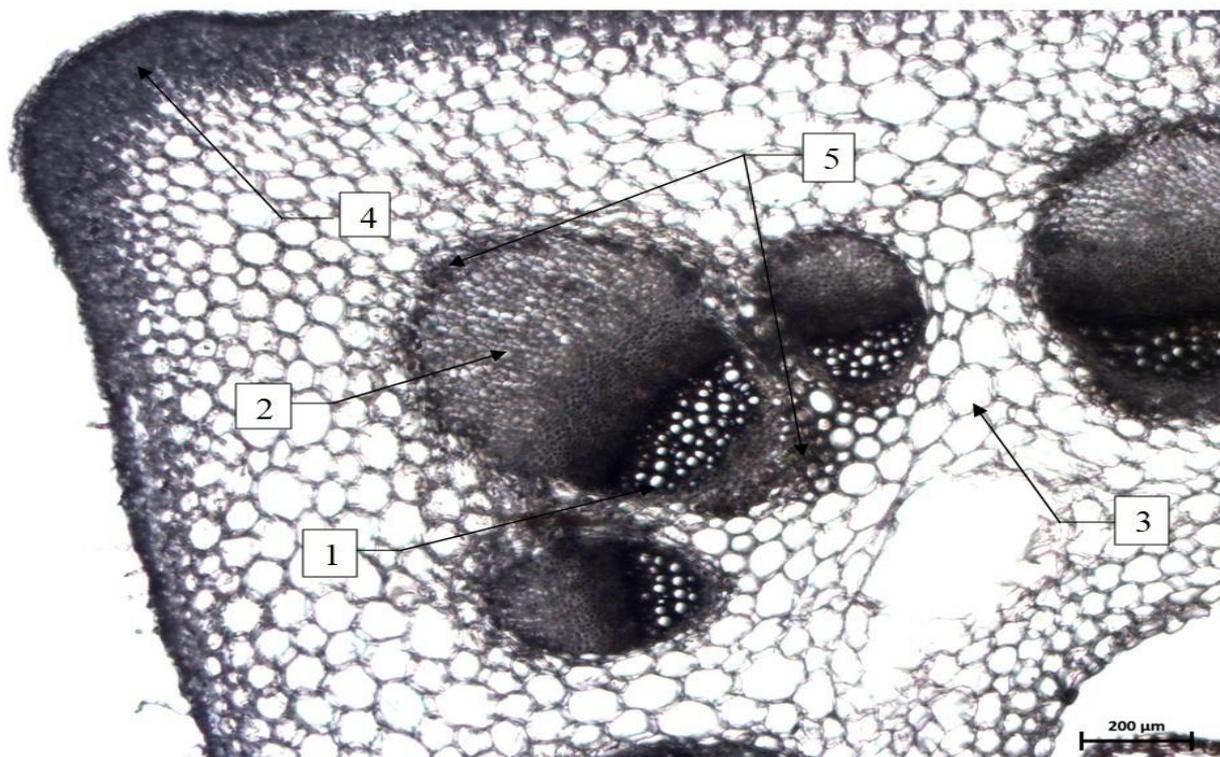


Рисунок 33 – Фрагмент поперечного среза черешка листа (ув.  $\times 10$ ): 1 – ксилема, 2 – флоэма, 3 – паренхима, 4 – колленхима, 5 – склеренхима.

## 5.2. Разработка товароведческих показателей качества сырья

При подготовке нормативной документации на новое лекарственное растительное сырье (ЛРС), требуется разработка соответствующих параметров качества. Основные числовые показатели – измельченность, потерю в массе при высушивании, зольность, содержание примесей в листьях *S. controversa* DC. – определяли в соответствии с методами анализа ЛРС, изложенными в Государственной фармакопее XIV издания [26]. Разработку показателей качества выполняли на 7 образцах сырья, собранных в Иркутской области, Республике Хакасия и Красноярском крае в различное время. Период наблюдения составил 3 года.

Для определения измельченности сырья использовали метод ситового анализа. Большинство частиц измельченного сырья имеют размер 6, 4 и 1 мм, в процентном отношении:  $36,38 \pm 4,87\%$ ;  $23,72 \pm 6,91\%$  и  $16,22 \pm 8,67\%$

соответственно (таблица 27). Предлагаемая норма по измельченности сырья: частиц, не проходящих сквозь сито с размером отверстий 6 мм не более 2%.

Таблица 27 – Результаты ситового анализа измельченности сырья, n= 3.

Место и год сбора	Количество частиц, не проходящих, сквозь отверстия диаметром: 7 мм (1), 6 мм (2), 5 мм (3), 4 мм (4), 3 мм (5), 1 мм (6), 0,5 мм (7), 0,25 мм (8), проходящих сквозь отверстия диаметром 0,25 мм (9), %								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Красно-ярский край, окр. оз. Инголь; 2016	-	44,04 ± 0,32	1,39 ± 0,24	34,35 ± 0,27	5,82 ± 0,30	10,53 ± 0,22	1,11 ± 0,15	1,66 ± 0,25	1,11 ± 0,20
Хакасия, окр. с. Мендоль; 2016	2,97 ± 0,12	30,08 ± 0,23	16,10 ± 0,19	27,12 ± 0,25	5,93 ± 0,37	10,59 ± 0,26	1,27 ± 0,14	3,39 ± 0,22	1,27 ± 0,29
Хакасия, окр. с. Ефремино; 2016	0,55 ± 0,09	-	6,21 ± 0,15	28,73 ± 0,32	7,73 ± 0,11	34,25 ± 0,30	4,42 ± 0,13	11,05 ± 0,28	5,05 ± 0,22
Иркутская обл., окр. с. Кочергат; 2014	0,68 ± 0,07	39,13 ± 0,35	2,52 ± 0,12	17,16 ± 0,25	10,07 ± 0,18	11,21 ± 0,21	5,72 ± 0,17	7,55 ± 0,22	5,95 ± 0,28
Хакасия, окр. с. Мендоль; 2017	1,91 ± 0,13	36,38 ± 0,24	7,09 ± 0,15	23,72 ± 0,26	7,42 ± 0,18	16,21 ± 0,23	3,10 ± 0,11	5,30 ± 0,15	2,79 ± 0,08
Хакасия, окр. с. Ефремино; 2017	2,03 ± 0,10	35,77 ± 0,39	15,45 ± 0,18	20,33 ± 0,20	6,50 ± 0,17	11,79 ± 0,25	2,44 ± 0,13	3,66 ± 0,15	2,03 ± 0,22
Хакасия, окр. с. Карлыбас; 2017	3,33 ± 0,18	32,90 ± 0,27	4,89 ± 0,21	14,66 ± 0,26	8,47 ± 0,11	19,54 ± 0,23	3,58 ± 0,19	4,56 ± 0,13	0,98 ± 0,09
X±x	1,91 ± 1,14	36,38 ± 4,87	7,66 ± 5,88	23,72 ± 6,91	7,42 ± 1,52	16,22 ± 8,67	3,10 ± 1,66	5,31 ± 3,11	2,74 ± 2,00

Определение количества примесей – побуревших и почерневших листьев, других фрагментов сырья (корни и стебли), частей других неядовитых растений, мелких камешков, земли и песка проводили в 3 повторных испытаниях. Результаты исследования приведены в таблице 28.

Таблица 28 – Содержание примесей в сырье *S. controversa* DC., n = 3.

Место и год сбора	Примеси: побуревших частей растения (1), органическая (2), минеральная (3), %		
	1	2	3
Красноярский край, окр. оз. Инголь; 2016	3,00 ± 0,07	0,80 ± 0,05	0,50 ± 0,04
Хакасия, окр. с. Мендоль; 2016	2,00 ± 0,09	0,60 ± 0,06	0,30 ± 0,03
Хакасия, окр. с. Ефремкино; 2016	3,00 ± 0,05	0,50 ± 0,09	0,20 ± 0,02
Иркутская обл., окр. с. Кочергат; 2014	1,00 ± 0,10	0,50 ± 0,07	0,00
Хакасия, окр. с. Мендоль; 2017	3,89 ± 0,12	1,53 ± 0,14	0,25 ± 0,02
Хакасия, окр. с. Ефремкино; 2017	3,00 ± 0,04	0,50 ± 0,02	0,20 ± 0,03
Хакасия, окр. с. Карлыбас; 2017	3,40 ± 0,22	1,23 ± 0,18	0,24 ± 0,05
X±x	2,75± 0,96	0,81± 0,40	0,24± 0,14

Среднее содержание побуревших и почерневших частей, органических и минеральных примесей в сырье составило 2,75 ± 0,96 %, 0,81 ± 0,40 % и 0,24 ± 0,14 % соответственно. Потеря в массе при высушивании составила 7,20 ± 0,84%, общая зола и зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте – 12,17 ± 1,31 % и 0,09 ± 0,03 соответственно (таблица 29).

Таблица 29 – Результаты определения влажности и зольности листьев *S. controversa* DC., n = 3.

Место и год сбора	Потеря в массе при высушивании, %	Зола общая, %	Зола, не растворимая в конц. HCl, %
Красноярский край, окр. оз. Инголь; 2016	7,27 ± 0,36	12,83 ± 0,64	0,100 ± 0,005

Хакасия, окр. с. Мендоль; 2016	8,81 ± 0,44	13,38 ± 0,67	0,060 ± 0,003
Хакасия, окр. с. Ефремино; 2016	6,86 ± 0,34	13,56 ± 0,69	0,090 ± 0,005
Иркутская обл., окр. с. Кочергат; 2014	6,26 ± 0,31	12,05 ± 0,60	0,050 ± 0,003
Хакасия, окр. с. Мендоль; 2017	7,40 ± 0,37	12,30 ± 0,74	0,140 ± 0,007
Хакасия, окр. с. Ефремино; 2017	7,38 ± 0,37	11,27 ± 0,56	0,110 ± 0,006
Хакасия, окр. с. Карлыбас; 2017	6,42 ± 0,32	9,79 ± 0,49	0,100 ± 0,005
X±x	7,20 ± 0,84	12,17 ± 1,31	0,09 ± 0,03

На основании проведенных исследований (глава 4) установлено, что наибольший вклад в остеогенную и иммуностропную активности на моделях *in vitro* вносят полисахариды, флавоноиды и хелидоновая кислота, выделенные из листьев *S. controversa* DC. Таким образом, для стандартизации растительного сырья с. спорной необходимо разработать и валидировать методики качественного и количественного определения данных групп БАВ.

### **5.3. Разработка и валидация методик качественного и количественного определения целевых БАВ в листьях *S. controversa* DC.**

Для разработки методик количественного и качественного определения целевых БАВ нами были изучены различные условия экстракции: соотношение сырье-экстрагент, кратность, время, температура экстракции, размер частиц сырья. В качестве экстрагента использовали 40% этиловый спирт. Оптимальные условия получения анализа оценивали по содержанию экстрактивных веществ, флавоноидов (УФ-спектроскопия), хелидоновой

кислоты (ВЭЖХ) и полисахаридов (гравиметрия). Результаты экспериментов представлены в таблице 30.

Таблица 30– Влияние параметров экстракции на содержание целевых веществ в экстракте сосюреи спорной, n=3.

№	Соотношение	Кратность	Время, мин	Т, °С	Размер частиц, мм	ЭВ, %	ФЛ, %	ХК, %	ПС, %
1	1:15 1:10 1:10	3	30	80	3-6	39,40±0,20	0,80±0,40	4,10±0,05	3,52±0,23
2	1:15 1:10 1:10	3	60	80	3-6	45,10±0,30	0,93±0,27	4,81±0,20	3,66±0,27
3	1:15 1:10 1:10	3	90	80	3-6	43,40±0,30	0,98±0,33	4,75±0,04	3,56±0,13
4	1:15 1:10	2	60	80	3-6	39,20±0,22	0,85±0,35	4,82±0,05	3,70±0,17
<b>5</b>	<b>1:15 1:15 1:15</b>	<b>3</b>	<b>60</b>	<b>80</b>	<b>3-6</b>	<b>45,70±0,31</b>	<b>1,25±0,20</b>	<b>5,02±0,09</b>	<b>4,24±0,12</b>
6	1:20 1:15 1:15	3	60	80	3-6	43,95±0,29	1,05±0,20	4,14±0,11	3,83±0,18
7	1:10 1:8 1:8	3	60	80	3-6	34,40±0,15	1,04±0,15	4,66±0,03	3,95±0,13
8	1:15 1:10 1:10	3	60	90	3-6	43,60±0,25	1,10±0,25	4,53±0,03	3,90±0,21
9	1:15 1:10 1:10	3	60	70	3-6	41,42±0,25	1,09±0,36	3,95±0,05	3,92±0,17
10	1:15 1:10 1:10	3	60	60	3-6	38,86±0,18	1,12±0,09	4,84±0,15	3,75±0,12
11	1:15 1:10 1:10	3	60	80	1	46,30±0,25	1,15±0,12	4,94±0,02	3,84±0,18
12	1:15 1:10 1:10	3	60	80	2-3	38,80±0,15	1,15±0,18	4,06±0,06	3,94± 0,29
13	1:15 1:10 1:10 1:10	4	60	80	3-6	40,06±0,15	1,01±0,30	4,92±0,23	4,05±0,17

\*Примечание: ЭВ – экстрактивные вещества

ФЛ – флавоноиды в пересчете на рутин;

ХК – хелидоновая кислота

ПС – полисахариды

Как видно из таблицы 30, оптимальными условиями получения анализа являются: трехкратная экстракция листьев *S. controversa* DC., измельченных до 3-6 мм в соотношении 1:15 при 80°C в течение 60 мин.

### **5.3.1. Пробоподготовка анализа**

Аналитическую пробу сырья массой 1,0 г (т.н.), измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3-6 мм помещали в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, экстрагировали 15 мл 40% этанолом трижды по 60 мин на водяной бане при температуре 80 °С. Извлечения объединяли и фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводили 40% этанолом до метки и перемешивали (раствор А)

### **5.3.2. Методики качественного обнаружения целевых БАВ**

1. Подлинность растительного сырья по наличию хелидоновой кислоты устанавливается при ее количественном определении методом ВЭЖХ. На хроматограмме испытуемого раствора (раствор А) должен наблюдаться пик с временем удерживания хелидоновой кислоты (рисунок 34).

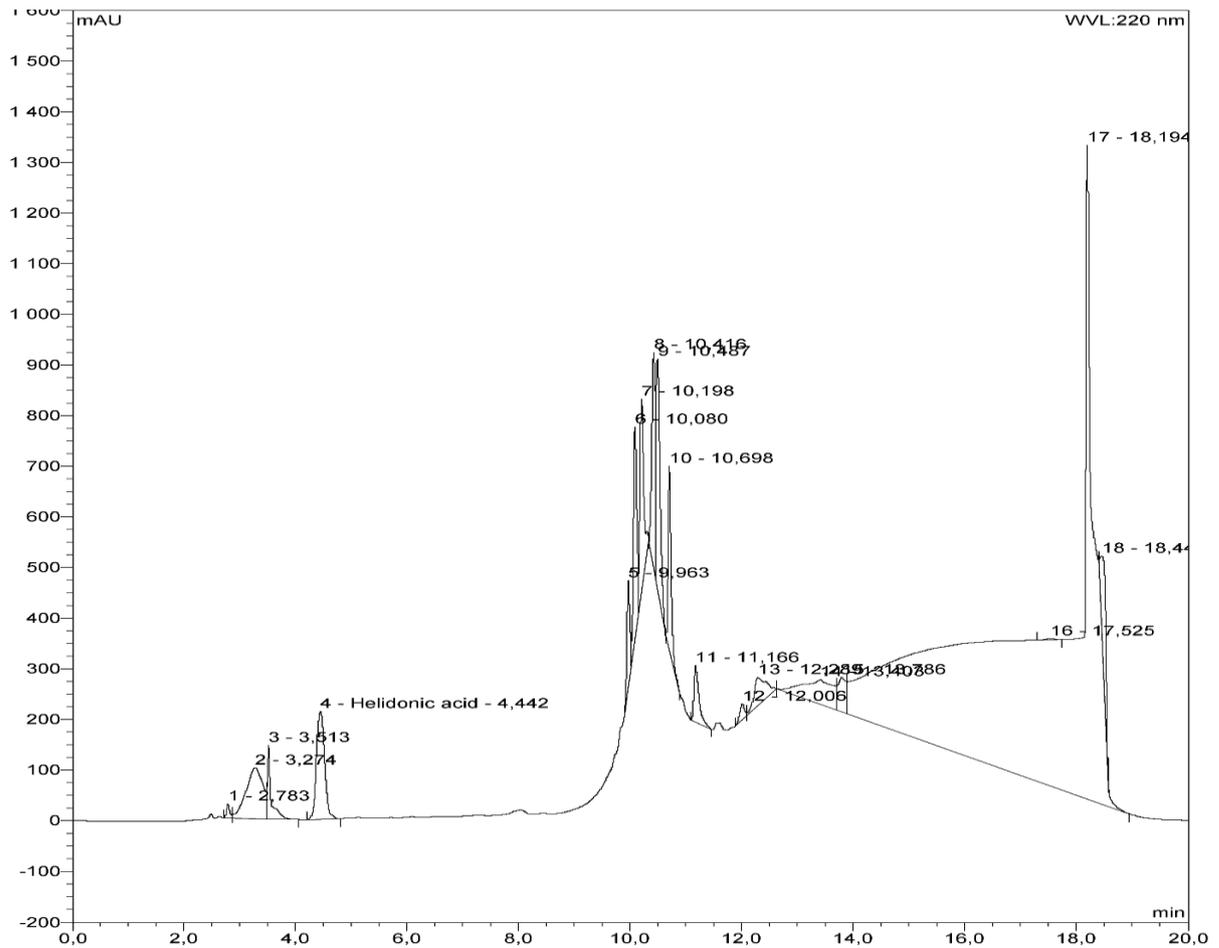


Рисунок 34 – Репрезентативная хроматограмма раствора А

2. К 5 мл раствора А прибавляли 5 мл 5% этанольного раствора хлорида алюминия, 0,3 мл концентрированной хлороводородной кислоты – наблюдали образование комплекса желтого цвета (флавоноиды).
3. 25 мл раствора А упаривали до 5 мл, прибавляли 20 мл 96% этанола, наблюдали выпадение хлопьевидного осадка (полисахариды).

### 5.3.3. Методики количественного определения целевых БАВ

#### 5.3.3.1. Количественное определение хелидоновой кислоты

Приготовление стандартного раствора хелидоновой кислоты: 0,0125 г (точная навеска) хелидоновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и растворяют в стартовой подвижной фазе, состоящей из 0,1 %-ого раствора трифторуксусной кислоты в воде и 0,1 %-ого раствора трифторуксусной кислоты в ацетонитриле (95:5), полученный раствор доводят до метки тем же растворителем. Аликвоту 1,0 мл полученного

раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объем колбы до метки тем же растворителем.

Аликвоты по 20 мкл раствора А и стандартного раствора хелидоновой кислоты хроматографируют в следующих условиях: колонка 25 × 4,6 см, Luna C18(2), 5 мкм, Phenomenex; подвижная фаза – элюент А: 0,05 % ТФУ в воде; элюент Б – 0,05 % ТФУ в ацетонитриле; режим элюирования – градиентный: 0-5 мин. – 5-10 % Б; 5-10 мин. – 10-100 % Б; 10-15 мин. – 100% Б; 15-20 мин. – 5 % Б; скорость потока: 1,0 мл/мин; температура колонки: 40 °С; детектор: УФ-спектрофотометрический или диодно-матричный, 220 нм; время регистрации хроматограмм: 20 мин.

Расчет содержания хелидоновой кислоты в пересчете на абсолютно сухое растительное сырье проводят по формуле:

$$X(\%) = \frac{S \times m_0 \times 4}{a \times S_0 \times (100 - w)}$$

где, S – площадь пика хелидоновой кислоты на хроматограмме раствора А, mAU×min;

S<sub>0</sub> – площадь пика на хроматограмме стандартного раствора, mAU×min;

m<sub>0</sub> – масса навески РСО хелидоновой кислоты, мг;

a – масса навески растительного сырья, г.

w – потеря в массе при высушивании, %

Среднее содержание хелидоновой кислоты составило 4,67 ± 0,19%

### **Валидация методики количественного определения хелидоновой кислоты в листьях *S. controversa* DC.**

Валидационные характеристики методики количественного определения хелидоновой кислоты в листьях *S. controversa* DC., приведены в таблицах 31-33.

Таблица 31 – Оценка повторяемости методики определения содержания хелидоновой кислоты в листьях *S. controversa* DC.

Уровень содержания, %	Масса навески, г	S, mAU×min	$C_i(\text{ХК})$ , мг/мл	$\bar{C}$ , мг/мл	RSD, %	$\Delta$ , мг/мл
80	0,8145	26,9111	0,0409	0,040	4,06	0,002
	0,8073	24,8956	0,0379			
	0,8199	26,5066	0,0403			
	0,8014	27,1032	0,0412			
	0,8257	25,1419	0,0382			
	0,8009	27,4641	0,0418			
100	1,0503	36,1506	0,0550	0,051	3,89	0,002
	1,0537	33,2177	0,0505			
	1,0235	33,4232	0,0508			
	1,0216	33,3727	0,0508			
	1,0519	32,3145	0,0491			
	1,0422	33,2099	0,0505			
120	1,2410	41,3666	0,0629	0,063	3,00	0,002
	1,2211	42,0213	0,0639			
	1,2047	39,8546	0,0606			
	1,2720	42,3468	0,0644			
	1,2849	43,0975	0,0655			
	1,21731	40,2904	0,0613			

Таблица 32 – Оценка воспроизводимости методики определения содержания хелидоновой кислоты в листьях *S. controversa* DC.

Уровень содержания, %	$C_i(\text{ХК})$ , мг/мл	$\bar{C}$ , мг/мл	$S_{x,i}$	F	$S_{x,j}$	$\bar{C}$ , мг/мл	RSD, %
80	0,0409	0,0401	0,00066	1,06	0,00155	0,0340	3,91
	0,0379						
	0,0403						
	0,0412						
	0,0382						
	0,0418						
	0,0398	0,0394	0,00063				
	0,0388						

Уровень содержания, %	$C_i(\text{ХК}), \text{ мг/мл}$	$\bar{C}, \text{ мг/мл}$	$S_{x,i}$	F	$S_{x,j}$	$\bar{C}, \text{ мг/мл}$	RSD, %
	0,0404						
	0,0376						
	0,0416						
	0,0379						
100	0,0550	0,0511	0,00081	1,18	0,00182	0,0516	3,54
	0,0505						
	0,0508						
	0,0508						
	0,0491						
	0,0505						
	0,0505	0,0521	0,00069				
	0,0531						
	0,0535						
	0,0495						
	0,0523						
	0,0535						
120	0,0629	0,0631	0,00077	1,05	0,00176	0,0632	2,79
	0,0639						
	0,0606						
	0,0644						
	0,0655						
	0,0613						
	0,0614	0,0632	0,00074				
	0,0624						
	0,0612						
	0,0656						
	0,0649						
	0,0636						

Таблица 33 – Оценка правильности методики определения хелидоновой кислоты в листьях *S. controversa* DC. методом «введено-найдено»

Уровень содержания, %	Введено ХК, мг/мл	Найдено, мг/мл	$\delta$
80	0,025	0,0651	99,83

100		0,0759	100,91
120		0,0885	98,47

По результатам валидации, методика количественного определения хелидоновой кислоты в листьях *S. controversa* DC. является валидной и может быть использована в проекте фармакопейной статьи на лекарственное растительное сырье.

### 5.3.3.2. Количественное определение флавоноидов

5 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 5 мл 5% этанольного раствора хлорида алюминия, 0,3 мл концентрированной хлороводородной кислоты и доводили 95% этанолом до метки. На основании экспериментальных данных полученных в предыдущей главе и показывающих, что мажорным флавоноидом является рутин, он выбран нами в качестве стандартного образца. Оптическую плотность испытуемого раствора измеряли на спектрофотометре при длине волны 410 нм через 60 мин. Параллельно измеряли оптическую плотность раствора стандартного образца рутина. Для этого 1 мл 0,02% м/об. раствора рутина-стандарта помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 5 мл 5% этанольного раствора хлорида алюминия, 0,3 мл концентрированной хлороводородной кислоты и доводили до метки 95% этанолом.

Приготовление раствора ГСО рутин: 0,0050 г (точная навеска) ГСО рутин, высушенного до постоянной массы при температуре 100-105°C, растворяли в мерной колбе вместимостью 25 мл в небольшом количестве подогретого 95% этанола и доводили объем до метки тем же растворителем.

Расчет содержания суммы флавоноидов (%) осуществляли по формуле:

$$X\% = \frac{A \cdot M_o \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{A_o \cdot M \cdot 5 \cdot 25 \cdot 25 \cdot (100 - w)} = \frac{A \cdot M_o \cdot 8000}{A_o \cdot M \cdot (100 - w)}$$

Где, А–оптическая плотность испытуемого раствора.

A<sub>o</sub>–оптическая плотность ГСО рутин (среднее из трех измерений).

M<sub>o</sub>–масса ГСО рутин, г.

M–масса навески сырья, г.

W–потеря в массе при высушивании, %.

Среднее содержание флавоноидов в пересчете на рутин составило 1,51 ± 0,67 %

**Валидация методики количественного определения флавоноидов в листьях *S. controversa* DC.**

Валидационные характеристики методики количественного определения флавоноидов в листьях *S. controversa* DC., приведены в таблицах 34-35.

Таблица 34 – Оценка повторяемости методики определения содержания флавоноидов в листьях *S. controversa* DC.

Уровень содержания, %	Масса навески, г	Оптическая плотность, mAU	$C_i$ (ФЛ), мг/мл	$\bar{C}$ , мг/мл	RSD, %	$\Delta$ , мг/мл
80	0,8145	0,3193	0,0169	0,0163	2,82	0,0005
	0,8073	0,2947	0,0157			
	0,8199	0,3096	0,0162			
	0,8014	0,2955	0,0159			
	0,8257	0,3145	0,0164			
	0,8009	0,3113	0,0167			
100	1,0503	0,4786	0,0196	0,0202	2,80	0,0006
	1,0537	0,5047	0,0206			
	1,0235	0,4759	0,0200			
	1,0216	0,4655	0,0196			
	1,0519	0,4989	0,0204			
	1,0422	0,5089	0,0210			
120	1,2410	0,6982	0,0242	0,0251	2,79	0,0007
	1,2211	0,7438	0,0262			
	1,2047	0,7058	0,0252			
	1,2720	0,7275	0,0246			
	1,2849	0,7409	0,0248			
	1,21731	0,7189	0,0254			

Таблица 35 – Оценка воспроизводимости методики определения содержания флавоноидов в листьях *S. controversa* DC.

Уровень содержания, %	$C_i$ (ФЛ), мг/мл	$\bar{C}$ , мг/мл	$S_{x,i}$	F	$S_{x,j}$	$\bar{C}$ , мг/мл	RSD, %
80	0,0169	0,0163	0,00019	1,39	0,0004	0,0165	2,55
	0,0157						
	0,0162						
	0,0159						
	0,0164						
	0,0167						
	0,0167	0,0166	0,00014				
	0,0162						
	0,0170						
	0,0163						
	0,0169						
	0,0167						
100	0,0196	0,0202	0,00023	1,11	0,0006	0,0205	3,07
	0,0206						
	0,0200						
	0,0196						
	0,0204						
	0,0210						
	0,0204	0,0207	0,00026				
	0,0206						
	0,0198						
	0,0216						
	0,0206						
	0,0212						
120	0,0242	0,0251	0,00029	1,44	0,0009	0,0248	3,48
	0,0262						
	0,0252						
	0,0246						
	0,0248						
	0,0254						
	0,0256	0,0246	0,00041				
	0,0238						
	0,0248						
	0,0244						
	0,0258						
	0,0232						

Таблица 36 – Оценка правильности методики определения содержания флавоноидов в листьях *S. controversa* DC., методом «введено-найдено»

Уровень содержания, %	Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	$\delta$
80	0,025	0,0415	99,18
100	0,025	0,0453	99,60
120	0,025	0,0498	101,08

По результатам валидации, методика количественного определения флавоноидов в листьях *S. controversa* DC., является валидной и может быть использована в проекте фармакопейной статьи на лекарственное растительное сырье.

### 5.3.3.3. Количественное определение полисахаридов

25 мл (аликвота) раствора А упаривали до 5 мл, прибавляли 20 мл 96% этанола, отстаивали в течение 15 минут, осадок переносили на предварительно взвешенный бумажный фильтр в воронке Бюхнера, промывали 15 мл 96% этанола, затем фильтр сушили до постоянной массы и взвешивали. Расчет содержания полисахаридов проводили по следующей формуле:

$$X\% = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot V_{\text{аликвоты}} \cdot (100 - w)}$$

Где  $m$  – масса навески сырья, г.

$m_1$  – масса фильтра, г.

$m_2$  – масса фильтра с осадком, г.

$w$  – потеря в массе при высушивании, %.

Среднее содержание полисахаридов составило  $5,88 \pm 1,24$ .

### Валидация методики количественного определения полисахаридов в листьях *S. controversa* DC.

Валидационные характеристики методики количественного определения полисахаридов в листьях *S. controversa* DC., приведены в таблицах 37-39.

Таблица 37 – Оценка повторяемости методики количественного определения полисахаридов в листьях *S. controversa* DC.

Уровень содержания, %	Масса навески сырья, г	$m_i(\text{ПС}), \text{ г}$	$\bar{m}, \text{ г}$	RSD, %	$\Delta, \text{ г}$
80	0,8145	0,0139	0,0138	4,22	0,0006
	0,8073	0,0132			
	0,8199	0,0142			
	0,8014	0,0135			
	0,8257	0,0147			
	0,8009	0,0134			
100	1,0503	0,0186	0,0179	3,74	0,0007
	1,0537	0,0177			
	1,0235	0,0178			
	1,0216	0,0172			
	1,0519	0,0188			
	1,0422	0,0173			
120	1,2410	0,0212	0,0211	3,17	0,0007
	1,2211	0,0205			
	1,2047	0,0209			
	1,2720	0,0214			
	1,2849	0,0222			
	1,21731	0,0203			

Таблица 38 – Оценка воспроизводимости методики определения содержания полисахаридов в листьях *S. controversa* DC.

Уровень содержания, %	$m_i(\text{ПС}), \text{ г}$	$\bar{m}, \text{ г}$	$S_{x,i}$	F	$S_{x,j}$	$\bar{m}, \text{ г}$	RSD, %
80	0,0134	0,0136	0,00021	1,20	0,00049	0,0138	3,55
	0,0133						
	0,0142						
	0,0129						
	0,0141						
	0,0134						
	0,0139	0,0139	0,00017				
	0,0135						
	0,0141						
	0,0137						
	0,0139						
	0,0147						
100	0,0186	0,0178	0,00023	1,02194	0,00061	0,0175	3,48
	0,0177						
	0,0178						

	0,0172	0,0172	0,00023				
	0,0183						
	0,0173						
	0,0165						
	0,0172						
	0,0168						
	0,0175						
	0,0181						
	0,0174						
120	0,0209	0,0208	0,00028	1,33	0,00061	0,0210	2,90
	0,0202						
	0,0203						
	0,0213						
	0,0220						
	0,0203						
	0,0210	0,0212	0,00021				
	0,0209						
	0,0214						
	0,0216						
	0,0218						
	0,0205						

Таблица 39 – Оценка правильности методики определения содержания полисахаридов в листьях *S. controversa* DC., методом «введено-найдено»

Уровень содержания, %	Введено, г	Найдено, г	$\delta$
80	0,025	0,0385	101,26
100		0,0422	102,85
120		0,0462	99,52

По результатам валидации, методика количественного определения полисахаридов в листьях *S. controversa* DC. является валидной и может быть использована в проекте фармакопейной статьи на лекарственное растительное сырье.

Результаты количественного определения БАВ в листьях и стеблях *S. controversa* DC. из различных мест сбора представлены в таблице 40.

Таблица 40 – Содержание БАВ в листьях и стеблях *S. controversa* DC., n=3

Место и год сбора	Листья <i>S. controversa</i> DC.			Стебли <i>S. controversa</i> DC.		
	Сод-е флавоноидов, %	Сод-е хелидоновой кислоты, %	Сод-е полисахаридов, %	Сод-е флавоноидов, %	Сод-е хелидоновой кислоты, %	Сод-е полисахаридов, %
Красноярский край, окр. оз. Инголь; 2016	1,26 ± 0,10	4,44 ± 0,10	8,12 ± 0,20	0,65 ± 0,12	1,10 ± 0,25	2,56 ± 0,38
Хакасия, окр. с. Мендоль; 2016	1,50 ± 0,19	5,47 ± 0,01	5,00 ± 0,50	0,72 ± 0,16	1,32 ± 0,09	2,14 ± 0,42
Хакасия, окр. с.Ефремино; 2016	1,06 ± 0,27	4,87 ± 0,11	4,98 ± 0,54	0,54 ± 0,11	1,21 ± 0,17	2,17 ± 0,35
Иркутская обл., окр. с. Кочергат; 2014	1,32 ± 0,20	5,05 ± 0,10	4,34 ± 0,14	0,61 ± 0,13	1,25 ± 0,29	2,05 ± 0,31
Хакасия, окр. с. Мендоль; 2017	1,22 ± 0,32	4,66 ± 0,57	6,82 ± 0,14	0,56 ± 0,16	1,12 ± 0,18	2,32 ± 0,25
Хакасия, окр. с.Ефремино; 2017	1,24 ± 0,12	3,87 ± 0,11	5,88 ± 1,36	0,52 ± 0,17	0,91 ± 0,22	2,25 ± 0,37
Хакасия, окр. с. Карлыбас; 2017	3,01 ± 0,11	4,29 ± 0,01	5,50 ± 0,58	0,49 ± 0,19	1,05 ± 0,35	2,18 ± 0,48
X±x	1,51 ± 0,19	4,67 ± 0,52	5,88 ± 1,24	0,58 ± 0,15	1,13 ± 0,22	2,24 ± 0,36

Таким образом, исходя из содержания БАВ представленных в таблице 40, целесообразна заготовка листьев без стеблей-цветоносов.

Также нами было изучено содержание БАВ листьев *S. controversa* DC. в различные фазы вегетации. Для эксперимента были отобраны листья имматурных, виргинильных и генеративных особей. Результаты опыта представлены в таблице 41.

Таблица 41 – Содержание БАВ в листьях *S. controversa* DC. различных вегетативных форм, n=3

Вегетативная форма	Содержание флавоноидов, %	Содержание хелидоновой кислоты, %	Содержание полисахаридов, %
Имматурная	0,77 ± 0,22	3,94 ± 0,23	11,32 ± 0,58
Виргинильная	0,92 ± 0,18	4,25 ± 0,17	8,74 ± 0,34
Генеративная (стеблевые и розеточные листья)	0,84 ± 0,28	4,89 ± 0,31	8,71 ± 0,45

Таким образом, различие в содержании целевых БАВ в растениях разных форм вегетации незначительно, поэтому к заготовке рекомендуются листья имматурных, виргинильных и генеративных особей *S. controversa* DC.

Результаты исследования норм качества листьев *S. controversa* DC., представлены в таблице 42.

Таблица 42 – Нормы качества сырья - листья *S. controversa* DC.

№ п/п	Показатели	Содержание в сырье, %	Закладываемые нормы, %
1.	Части сырья, утратившие окраску (почерневшие, пожелтевшие)	2,75 ± 0,96	не более 4,0
2.	Части других не ядовитых растений	0,81 ± 0,40	не более 1,5

3.	Минеральная примесь	$0,24 \pm 0,14$	не более 1,0
4.	Потеря в массе при высушивании	$7,20 \pm 0,84$	не более 8,5
5.	Зола общая	$12,17 \pm 1,31$	не более 14,0
6.	Зола нерастворимая в 10%-м растворе хлористоводородной кислоты	$0,09 \pm 0,03$	не более 0,3
7.	Сумма флавоноидов	$1,06 \pm 0,27$	не менее 0,8
8.	Хелидоновая кислота	$3,87 \pm 0,11$	не менее 3,0
9.	Сумма полисахаридов	$4,34 \pm 0,14$	не менее 4,0

### Выводы к главе 5

1. В ходе морфолого-анатомического исследования листьев *S. controversa* DC. выявлены основные макро- и микродиагностические признаки, необходимые для идентификации сырья. К микродиагностическим признакам относятся:

- аномоцитный тип устьичного аппарата;

- устьичный индекс  $25,8 \pm 0,6\%$ .

- волоски, расположенные на нижнем эпидермисе: 2-3 клеточные головчатые волоски; 2-3 клеточные бичевидные волоски, состоящие из двух небольших клеток бочонковидной или пьедестальной формы в основании и основной длинной клетки; 4-клеточные волоски с тремя округлыми бочонковидными клетками в основании и одной верхушечной длинной бичевидной клетки;

- 5-7 коллатеральных пучков в центральной жилке листа;

- 10-14 коллатеральных пучков и уголкового колленхима в черешке листа.

2. Разработаны и валидированы методики количественного определения целевых групп БАВ (флавоноиды, полисахариды, хелидоновая кислота).

3. В результате фармакогностического исследования 7 образцов сырья определены нормы качества для его стандартизации и разработки проекта ФС на сырье.

## ВЫВОДЫ

1. Согласно анализу литературных данных, *S. controversa* DC. является перспективным объектом для исследования фармакологического воздействия на ключевые патогенетические звенья остеомиелита, выявления целевых групп БАВ, ответственных за биологическую активность, их стандартизации для разработки и внедрения НД в фармацевтическую практику.

2. Листья *S. controversa* DC. содержат сесквитерпеновые лактоны, сапонины, дубильные вещества, кумарины, флавоноиды ( $1,20\% \pm 0,05\%$ ), фенолкарбоновые кислоты ( $4,46\% \pm 0,76\%$ ), эфирное масло ( $0,51\% \pm 0,07\%$ ), полисахариды, аминокислоты, макро- и микроэлементы.

3. Хроматографическими методами (БХ, ТСХ, ВЭЖХ) впервые для данного вида идентифицированы фенолкарбоновые кислоты (коричная, кофейная, хлорогеновая, галловая, хинная, салициловая), аминокислоты (валин, аргинин, треонин, лизин, глицин), флавоноиды (кверцетин, рутин, кемпферол, дигидрокверцетин), кумарины (умбеллиферон, эскулетин), тритерпеновые сапонины (олеаноловая и урсоловая кислоты).

4. Полисахаридные комплексы водного извлечения и экстракта на 40% этаноле *S. controversa* DC. охарактеризованы по молекулярно-массовому распределению, содержанию белка, количественному соотношению и мономерному составу нейтральных и кислых сахаров. Технологический выход фракций ПС составил: ФПС<sub>1</sub> ( $1,93\% \pm 0,35\%$ ); ФПС<sub>2</sub> ( $0,74\% \pm 0,16\%$ ); ФПВ ( $10,52\% \pm 1,58\%$ ) и из экстракта на 40% этаноле: ПССЭ ( $6,15 \pm 0,62\%$ ). Основными структурными мономерами ФПС<sub>1</sub>, ФПС<sub>2</sub> и ПССЭ являются галактоза и арабиноза, а  $\Sigma$ ПВ – уроновые кислоты.

5. В результате проведенных исследований установлены целевые БАВ экстракта *S. controversa*: полисахариды, гликозиды кверцетина (7-О- $\alpha$ -L-рамнозид-3-О- $\beta$ -D-глюкозид кверцетина, 3-О- $\beta$ -D-диглюкозид-О- $\alpha$ -L-рамнозид кверцетина, рутин), хелидоновая кислота, перспективные для дальнейшего изучения их биологической активности.

6. Экстракт на 40% этаноле *S. controversa* DC. согласно ГОСТ (12.1.007-76) относится к IV классу опасности – «Вещества малоопасные». Все целевые БАВ экстракта на 40% этаноле *S. controversa* DC. проявляют в эксперименте статистически достоверную остеогенную активность, стимулируя дифференцировку ММСК в остеобласты, в ряду: хелидоновая кислота < гликозиды кверцетина < полисахариды. По величине стимулирования NO-синтазной активности макрофагов целевые БАВ формируют следующий ряд: рутин < кверцетин-3-О-β-D-диглюкопиранозил-О-α-L-рамнопиранозид < кверцетин-7-О-β-D-глюкопиранозил-3-О-α-L-рамнопиранозид < хелидоновая кислота < полисахариды.

7. В ходе морфолого-анатомического исследования листьев *S. controversa* DC. выявлены основные макро- и микродиагностические признаки, необходимые для идентификации сырья; разработаны и валидированы методики количественного определения целевых групп БАВ (флавоноиды, полисахариды, хелидоновая кислота); определены нормы качества на сырье и разработан проект ФС – «Сосюреи спорной листья».

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Авдеева, Е.Ю. Исследование активности экстрактов *Saussurea controversa* и *Filipendula ulmaria* при экспериментальном остеомиелите методом трехфазной сцинтиграфии / Е.Ю. Авдеева, М.А. Зоркальцев, В.Д. Завадовская, Г.В.Слизовский, Е.А. Краснов, Г.В. Пехенько, М.Ю. Степанов // Бюллетень сибирской медицины. – 2015. – №3. – С.5–9.
2. Авдеева, Е.Ю. Содержание полисахаридов в надземной части *Saussurea controversa* DC / Е.Ю. Авдеева, Е.А. Краснов, А.А. Семенов // Химия раст. сырья. – 2015. – №3. – С.43–48.
3. Авдеева, Е.Ю. Биохимическое исследование активности экстрактов *Saussurea controversa* DC. и *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. при экспериментальном остеомиелите / Е.Ю. Авдеева, Э.В. Сапрыкина Г.В. Слизовский, Е.А. Краснов, М.Ю. Степанов, В.Г. Пехенько // Бюллетень сибирской медицины. – 2016. – №2. – С. 5–12.
4. Авдеева, Е.Ю. Содержание флавоноидов в надземной части *Saussurea controversa* DC. (Asteraceae) / Е.Ю. Авдеева, Е.А. Краснов, А.А. Семенов // Химико-фармацевтический журнал. – 2017. – № 2. – С.28–29.
5. Авдеева, Е.Ю. Компонентный состав фенольных соединений семи видов *Saussurea* / Е.Ю. Авдеева, Л.Н. Зибарева, Е.А.Кастерова, Я.Е. Решетов, М.Н. Шурупова, М.В. Белоусов // Химия раст. сырья. – 2018. – №4. – С. 197–204.
6. Авдеева, Е.Ю. Сравнительная оценка остеогенной активности и влияния на гемопозитическую функцию красного костного мозга фракций экстрактов *Saussurea controversa* и *Filipendula ulmaria* при экспериментальном остеомиелите / Е.Ю. Авдеева, М.Г. Скороходова, И.В.Суходоло, Е.Д. Порохова, Г.В. Слизовский, Л.С. Муштоватова, Я.Е. Решетов, С.Д. Иванов, М.В. Белоусов // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – №3. – С. 6–14.
7. Авдеева, Е.Ю., Исследование фенольных соединений сосюреи спорной: «Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья»

- материалы V Всеросс. конф. с междунар. участием / Е.Ю. Авдеева, Е.А. Краснов, А.А. Семенов, С.Н. Соколова. – Барнаул, 2012. – С. 259–260.
8. Авдеева, Е.Ю. Исследование элементного состава Соссюреи спорной: «Актуальные проблемы современной науки» сборник материалов XI Телеконференции с международным участием / Е.Ю. Авдеева, Е.А. Краснов. – Томск, 2013. – С. 102–103.
  9. Авцын, А.П. Микроэлементозы человека / А.П. Авцын, А.А. Жаворонков, М.А. Риш, Л.С. Строчкова. – М.: Медицина, 1991. – 496 с.
  10. Ахмедов, Р. Растения — твои друзья и недруги / Р. Ахмедов. – Уфа: Китап, 2008. – 480 с.
  11. Бакуридзе, А.Д. Иммуномодуляторы растительного происхождения / А.Д. Бакуридзе, М.Ш. Курцикидзе, В.М. Писарев, Р.В. Махарадзе, Д.Т. Берашвили // Химико-фармацевтический журнал. – 1993. – № 8. – С. 43–49.
  12. Белохвостикова, Т.С. Иммунологическое прогнозирование нарушений регенерации костной ткани / Т.С. Белохвостикова, И.М. Михалевич // Сибирское медицинское обозрение. – 2018. – №3. – С. 98–104.
  13. Березовская, Т.П., Методы микроскопического анализа ботанических объектов / Т.П. Березовская, Н.В. Дощинская, Е.А.Серых. – Томск: Красное знамя, 1978. – 139 с.
  14. Беслекоев, У.С. Восстановление дефектов длинных костей конечностей после огнестрельных остеомиелитов / У.С. Беслекоев, М.М. Федосеев, А.Н. Анипченко // Воен.- мед. журн. – 2005. – №6. – С. 19–21.
  15. Бобожонов, А.А. Лекарственное растение Сирень обыкновенная / А.А. Бобожонов, И.Д. Кароматов // Электронный научный журнал «Биология и интегративная медицина». – 2017. – №6. – С.48–53.
  16. Борсук, О.С. Исследование влияния препаратов растительного происхождения, на развитие иммунного ответа / О.С. Борсук, Н.В. Масная, Е.Ю.Шерстобоев, Н.В. Исайкина, Г.И. Калинкина, Д.В. Рейхарт // Бюллетень

- экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т.151. – №2. – С.157–159.
17. Быструшкина, Е.В. Биохимическое разнообразие горькуш высокогорий Урала / Е.В. Быструшкина, Л.И. Алексеева, А.Г. Быструшкин // *Turczaninowia*. – 2012. – №15. – С. 114 – 119.
  18. Винник, Ю.С. Хронический остеомиелит: диагностика, лечение, профилактика / Ю.С. Винник, Н.М. Маркелова, А.А. Шагеев // *Сибирское медицинское обозрение*. – 2009. – № 6. – С. 12–15.
  19. Винник, Ю.С. Хронический остеомиелит: диагностика, лечение, профилактика / Ю.С. Винник, Е. И. Шишацкая, Н. М. Маркелова, А. П. Зуев // *Московский хирургический журнал*. – 2014.– №2. – С.50–53.
  20. Волхонская, Т.А. Биологически активные вещества растений рода *Соссюреи*: тез. докл. науч. конф. «Лекарственные растения в традиционной и народной медицине» / Т.А. Волхонская, И.М. Красноборов, О.И. Фролова. – Улан-Удэ, 1987. – С. 38–39.
  21. Вылцан, Н.Ф. Определитель растений Томской области / Н. Ф. Вылцан. – Томск: Изд-во Томского Университета, 1994. – 301 с.
  22. Гаврилов, А.Н. Клинические, морфологические и бактериологические характеристики остеомиелитического очага и перифокальной области / А.Н. Гаврилов, Е.В. Перова // *Фундаментальные исследования*. – 2005. – № 5 – С. 44–45.
  23. Гаммерман, А.Ф. Лекарственные растения (Растения-целители) / А.Ф. Гаммерман, Г.Н. Кадаев, А.А. Яценко-Хмелевский. – М.: Высшая школа, 1990. – 544 с.
  24. Георгиевский, В.П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В.П. Георгиевский, Н.Ф. Комиссаренко, С.Е. Дмитрук. – Новосибирск: Наука, 1990. – 333 с.

25. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издание / Министерство здравоохранения Российской Федерации. – 2018. – Т.2. – 1814 с.
26. Гринев, М.В. Остеомиелит. / М.В.Гринев. – М.: Медицина, 1977. – 152 с.
27. Дейнека, В.И. Каротиноиды лепестков цветков календулы / В.И. Дейнека, И.А. Гостищев, М.Ю. Третьяков, И.В. Индина // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: естественные науки. – 2011. – №15-2. – С.277– 285.
28. Дейнеко, И.П. Элементный и групповой химический состав коры и древесины осины / И.П. Дейнеко, Н.М. Фаустова // Химия растительного сырья. – 2015. – №1. – С. 51– 62.
29. Дутова, С.В. Перспективы исследования иммуотропных фитопрепаратов / С.В.Дутова, М.Р. Карпова // Вестник Хакасского Государственного Университета им. Н.Ф. Катанова. – 2016. – №18. – С.117–121.
30. Ермаков, А.И. Методы биохимического исследования растений. / А.И. Ермаков, В.В. Арасимович, М.И. Смирнова-Иконникова, Н.П. Ярош, Г.А. Луковникова. – Л.: Колос, 1972. – 456 с.
31. Задорожный, А.М. Справочник по лекарственным растениям / А.М. Задорожный, А.Г.Кошкин, С.Я. Соколов, А.И. Шретер. – М.: Лесн. пром-ть, 1988. – 415 с.
32. Иванова, Н.В., Общая характеристика полисахаридов коры лиственницы / Н.В.Иванова, Р.Г. Оводова, В.А. Бабкин // Химия растительного сырья. – 2006. – №1. – С.15–20.
33. Изотова, М.А. Травник: Лучшие рецепты народной медицины / М.А. Изотова, Т.Ф. Плотникова, Ю.И. Кирова, Н.А. Сарафанова. – М.: Эксмо, 2007. – 896 с.
34. Касьянов, З.В. Анализ химического состава и противовоспалительная активность полисахаридного комплекса листьев Бодяка разнолистного / З.В.Касьянов, К.Л. Ганькова, М.В. Шустов, А.Г. Гольдштейн // Журнал

научных статей здоровье и образование в XXI веке. – 2018. – Т.20. – №8. – С. 94–98.

35. Кириченко, Е.Е. Исследования противовоспалительной активности полисахарида цветков пижмы обыкновенной / Е.Е. Кириченко, И.А. Сычев, Г.Ю. Чекулаева // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова. – 2012. – №3. – С.53–57.
36. Корулькин, Д.Ю. Природные флавоноиды / Д.Ю. Корулькин, Ж.А. Абилов, Р.А. Музычкина, Г.А. Толстикова. – Новосибирск: Тео, 2007. – 232 с.
37. Кочетков, Н.К. Химия углеводов / Н.К. Кочетков, А.Ф. Бочков, Б.А. Дмитриев, А.И. Усов, О.С. Чижов, В.Н. Шибяев. – М.: Химия, 1967. – 674 с.
38. Красноборов, И. М. Флора Сибири. Т. 13: Asteraceae (Compositae) / И. М. Красноборов. – Новосибирск: Наука, 1997. – 472 с.
39. Краснов, Е.А. Выделение и анализ природных биологически активных веществ / Е.А. Краснов, Т.П. Березовская, Н.В. Алексеюк, Н.И. Белоусова, Л.А. Демиденко, В.В. Дудко, С.Е. Дмитрук, Г.И. Калинкина, Г.А. Романова. – Томск: Изд-во Томского университета, 1987. – 184 с.
40. Кутин, А.А. Гематогенный остеомиелит у взрослых / А.А.Кутин, Н.И. Мосиенко. – М.: Медицина и жизнь, 2000. – 224 с.
41. Лавренова, Г.В., Энциклопедия лекарственных растений / Г.В. Лавренова, В.К. Лавренов. – Донецк: Донеччина, 1997. – Т.1. – 279 с.
42. Лазурьевский, Г.В. Практические работы по химии природных соединений / Г.В. Лазурьевский, И.В. Терентьева, А.А. Шамшурин. – М.: Высшая школа, 1966. – 335 с.
43. Ларькина, М.С. Изучение динамики накопления фенолкарбоновых кислот в надземной части василька шероховатого / М.С. Ларькина, Т.В. Кадырова, Е.В. Ермилова // Химия растительного сырья. – 2008. – №3. – С. 71–74.
44. Леонова, С.М. Классификация хронического травматического остеомиелита / С.М. Леонова, А.В. Рехов, Д.Г. Данилов, А.В. Золотарев, И.А. Очиров // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2006. – № 4. – С. 158–163.

45. Лигачева, А.А. Влияние способа получения на состав полисахаридов *Saussurea controversa* DC. и их NO-стимулирующую активность / А.А. Лигачева, Я.Е. Решетов, Е.Ю. Авдеева, М.Г. Данилец, Е.С. Трофимова, Е.Ю. Шерстобоев, М.В. Белоусов // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2019. – Т.22. – № 7. – С. 32–37.
46. Липшиц, С. Ю. Род *Saussurea* DC. (Asteraceae) / С. Ю. Липшиц. – Л., Наука, 1979. – 283 с.
47. Ловкова, М.Я. О возможности использования лекарственных растений для лечения и профилактики микроэлементозов и патологических состояний / М.Я. Ловкова, Г.Н. Бузук, С.М. Соколова, Л.Н. Дервяго // Микроэлементы в медицине. – 2005. – №6. – С. 3–10.
48. Мазнев, Н.И. Высокоэффективные лекарственные растения / Н.И. Мазнев. – М.: Эксмо, 2012. – 608 с.
49. Максютин, Н.П. Растительные лекарственные средства / Н.П. Максютин, Н.Ф. Комиссаренко, А.П. Прокопенко. – К.: Здоров`я, 1985. – 280 с.
50. Маркова, А. Травник. Золотые рецепты народной медицины / А. Маркова. – М.: Эксмо, 2007. – 928 с.
51. Масликов, В.М. Актуальные вопросы хирургии детского возраста: 50 лет детской хирургии Томской области, Сб. науч. тр. Томского университета / В.М. Масликов, О.Н. Афанасьев, Л.Б. Ерошенко.– Томск, 1996. – С.48–50.
52. Микулич, Е.В. Современные принципы лечения хронического остеомиелита / Е.В. Микулич // Вестник новых медицинских технологий. – 2012. – № 2. – С.180–184.
53. Миронов, А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / А.Н. Миронов. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.
54. Науменко, Н.И. К вопросу о секторных флористических границах в Южном Зауралье / Н.И. Науменко // Вестник Удмуртского Университета. – 2016. – Т.26. – №2. – С.75–83.

55. Новомлинский, В. В. Современные аспекты диагностики и лечения остеомиелита / В. В. Новомлинский, Н.А. Малкина, А.А. Андреев, А.А. Глухов, Е.В. Микулич // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 5. – С.122.
56. Николаева, И.Г. Микроэлементный состав сушеницы топяной / И.Г. Николаева, Г.Г. Николаева // Сибирский медицинский журнал. – 2005. – №6. – С. 64–65.
57. Нурмухаметова, К.А. Исследование некоторых видов сосюреи как противопаразитарного средства.: автореф. дис... канд. фарм. наук: 14.04.02 / К.А. Нурмухаметова. – Пермь, 2000. – 23 с.
58. Оленников, Д.Н. Исследование химического состава алоэ древовидного (*Aloe Arborescens* Mill.) / Д.Н. Оленников, И.Н. Зилфикаров, Т.А. Ибрагимов // Химия растительного сырья. – 2010. – №3. – С. 77–82.
59. Перевозчикова, Т. В. Влияние экстрактов *Saussurea controversa* и *Fillipendula ulmaria* на иммунологическую реактивность крыс с экспериментальным остеомиелитом / Т. В. Перевозчикова, Е. Ю. Авдеева, Е. А. Файт, М. Г. Скороходова, Е. А. Краснов // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2016. – Т. 79. – № 7. – С. 68–72.
60. Погодин, И.С. Химический состав растений рода *Saussurea* DC. произрастающих на территории Сибири / И.С. Погодин, Е.А. Лукша, Н.А. Предейн // Химия растительного сырья. – 2014. – №3. – С.43–52.
61. Погодин, И.С. Фитохимическое исследование надземной части сосюреи горькой (*Saussurea amara* L.) / И.С. Погодин, Е.А. Лукша, К.А. Нурмухаметова, С.М. Адекенов, С.А. Ивасенко // Омский научный вестник. – 2010. – №1. – С.114–118.
62. Погодин, И.С. Фармакологическое изучение сосюреи горькой / И.С. Погодин, Е.А. Лукша // Омский научный вестник. – 2012. – №2. – С.49–52.

63. Положий, А.В. Определитель растений юга Томской области / А.В. Положий, А.С. Ревушкин, В.В. Баранова. – Томск: Изд-во Томского Университета, 1985. – 211 с.
64. Пат. Российская Федерация, № 2587784, 06.01.2011. Композиции и способы полисахаридов алоэ / И. Е. Данхов – № 2587784, 2016.
65. Пат. Российская Федерация, № 2416415, 08.02.2010. Средство для лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата человека и животных, в том числе переломов костей и заболеваний, связанных с дефицитом кальция в организме, на основе соли кальция / А. Л. Боришпольский, Г. Ю. Князькин, С. А. Малютин, О. В. Полухин, И. П. Пьянзина – № 2416415, 2011
66. Пат. Российская Федерация, № 2584402, 18.03.2015. Способ моделирования травматического остеомиелита / Е.Ю. Авдеева, Г.В. Слизовский, М.Г. Скороходова, Т.И. Фомина, М. А. Зоркальцев, В. В. Иванов, Е. А. Краснов – № 2584402, 2016.
67. ПНД Ф 16.1:2.3:3.11-98. Количественный химический анализ почв. Методика выполнения измерений содержания металлов в твердых объектах методом спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой. М., 1998. 31 с.
68. ПНД Ф 16.2.2:2.3.71-2011 Количественный химический анализ почв. Методика измерения массовых долей металлов в осадках сточных вод, донных отложениях, образцах растительного происхождения спектральными методами. М., 2011. 38 с.
69. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 11.08.2005 № 520 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным остеомиелитом».
70. Решетов, Я.Е. Сравнительное исследование элементного состава и биологически активных веществ растений рода *Saussurea* / Я.Е. Решетов, М.В. Белоусов, Е.Ю. Авдеева, М.Н. Шурупова // Химия растительного сырья. – 2018. – №4. – С. 205–214.
71. Решетов, Я.Е. Полисахариды трех видов *Saussurea* DC (*S. controversa*, *S. salicifolia*, *S. frolovii*): выделение, характеристика и влияние на NO-

- продуцирующие свойства макрофагов / Я.Е. Решетов, А.А. Лигачёва, Е.Ю. Авдеева, М.Г. Данилец, В.В. Головченко, Е.С. Трофимова, Е.И. Гулина, Е.Ю. Шерстобоев, А.М. Гурьев, К.И. Ровкина, С.В. Кривошеков, М.В. Белоусов // Химия растительного сырья. – 2019. – № 4. – С. 77–85.
72. Родионова, Л.В. Изменение показателей минерального обмена у больных хроническим остеомиелитом / Л.В. Родионова, С.В. Леонова // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2006. – № 4. – С. 278–282.
73. Рыбалко, К.С. Природные сесквитерпеновые лактоны / К.С. Рыбалко. – М.: Медицина, 1978. – 319 с.
74. Рюшина, В.А. Идентификация биологически активных компонентов *Aloe arborescens* Mill. / В.А. Рюшина, Н.Г. Габрук, Т.А. Шутеева // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Естественные науки. – 2010. – вып. 10. – №3. – С.93–96.
75. Сакович, Н.В. Современные аспекты этиологии, диагностики и лечения остеомиелита / Н.В. Сакович, А.А. Андреев, Е.В. Микулич, А.П. Остроушко, В.Г. Звягин // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2018. – Т.11. – №1. – С. 70–79.
76. Салохин, А.В. Стоматография листьев короткокорневищных видов *Cypripedium* (Orchidaceae) Восточной Сибири и Дальнего Востока / А.В.Салохин, С.А. Волкова, П.Г. Горовой // Turczaninowia. – 2005. – №8. – С.69–74.
77. Свиридова, Т.П. Биологические особенности *Saussurea controversa* DC. (Asteraceae) при интродукции на юге Томской области / Т.П. Свиридова // Вестник Томского государственного университета. – 2012. – №356. – С.176–178.
78. Свиридонов, Г.М. Полезные растения Горного Алтая / Г.М. Свиридонов. – Горно-Алтайск: Алтайское книжное изд-во, 1978. – 231 с.

79. Скалозубова, Т.А. Полисахариды в листьях и настое крапивы двудомной / Т.А. Скалозубова, А.И. Марахова, А.А. Сорокина, Н.Н. Федоровский // Фармация. – 2012. – №2. – С. 5–7.
80. Соколов, П.Д. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, и их химический состав, использование; Семейство Asteraceae (Compositae) / П.Д. Соколов. – СПб.: Наука, 1993. – 352 с.
81. Соколова, С.Н. Изучение химического состава и биологической активности *Saussurea controversa*: тез. докл. науч. конф. «Всероссийская 70-я итоговая научная студенческая конференция им. Н.И. Пирогова» / С.Н. Соколова. – Томск, 2011. – С.233-234.
82. Степочкин, С. Сборник народных рецептов лечения заболеваний опорно-двигательного аппарата / С. Степочкин. – Екатеринбург: Издательские решения, 2015. – 614 с.
83. Сырчина, А.И., Семенов А.А. Иммуномодуляторы из *Saussurea controversa* и *Cirsium setosum*: тез. докл. науч. конф. посвященной памяти В.Г.Минаевой «Физиолого-биохимические аспекты изучения лекарственных растений», / А.И. Сырчина, А.А. Семенов. – Новосибирск, 1998. – С.61–62.
84. Сырчина, А.И. О химическом составе экстрактивных веществ *Saussurea controversa* / А.И. Сырчина, А.В. Черноусова, А.Л. Верещагин, А.А. Семенов // Химия природных соединений. – 1993. – №5. – С.765–766.
85. Телятьев, В.В. Целебные клады Восточной Сибири / В.В. Телятьев. – Иркутск: Восточно-Сибирское книжное издательство, 1976. – 445 с.
86. Телятьев, В.В. Полезные растения Центральной Сибири / В.В. Телятьев. – Иркутск: Восточно-Сибирское книжное издательство, 1985. – 384 с.
87. Федосеева, А.А. Состав и антирадикальная активность экстрактов сирени / А.А. Федосеева, О.С. Лебедкова, Л.В. Каниболоцкая, А.Н. Шендрик, В.В. Дудзинская, Л.Н. Ткаченко, Н.В. Шинева // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т.45. – №2. – С.29–30.

88. Хобракова, В.Б. Влияние фенольных и полисахаридных соединений растительного происхождения на состояние иммунной системы организма при экспериментальной иммунодепрессии / В.Б. Хобракова, Д.Н. Оленников // Вестник Бурятского государственного университета. – 2012. – № S 3. – С.176–181.
89. Шарова, О.В. Флавоноиды цветков календулы лекарственной / О.В. Шарова, В.А. Куркин // Химия растительного сырья. – 2007. – №1. – С. 65–68.
90. Яковлева, О.А. Антимикробная и антиоксидантная активность сирени сорта «М. Шолохов» *in vivo* и в культуре *in vitro* / О.А. Яковлева, Л.А. Любаковская // Вестник ВГМУ. – 2010. – Т.9. – №1. – С. 1–6.
91. Ajay, S. Therapeutic charm of quercetin and its derivatives: a review of research and patents / S. Ajay, K. Dharambir, S. Katrin, S. T. Hardeep, K. S. Anil // Pharmaceutical Patent Analyst. – 2018. – Vol.7. – P.15–32.
92. An, J. Natural products for treatment of bone erosive diseases: The effects and mechanisms on inhibiting osteoclastogenesis and bone resorption / J. An, D. Hao, Q. Zhang, B. Chen, R. Zhang, Y. Wang, H. Yang // International Immunopharmacology. – 2016. – Vol. 36. – P. 118–131.
93. Avdeeva, E. Chemical analysis of bioactive substances in seven siberian Saussurea species / E. Avdeeva, Ya. Reshetov, M. Belousov, M. Shurupova, L. Zibareva, E. Borisova // AIP Conference Proceedings. – 2017. – Vol. 1899. – P. 050001-1–050001-7.
94. Avdeeva, E. Flavonol glycosides from Saussurea controversa and their efficiency in experimental osteomyelitis / E. Avdeeva, E. Shults, M. Skorokhodova, Ya. Reshetov, E. Porokhova, I. Sukhodolo, E. Krasnov, M. Belousov // Planta medica international open. – 2018. – Vol. 5. – № 01. – P. e24–e29.
95. Avdeeva, E. Chelidonic acid and its derivatives from Saussurea controversa: isolation, structural elucidation and influence on the osteogenic differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells *in vitro* / E. Avdeeva, E. Shults, T. Rybalova, Ya. Reshetov, E. Porokhova, I. Sukhodolo, L. Litvinova, V.

- Shupletsova, O. Khaziakhmatova, I. Khlusov, A. Guryev, M. Belousov // *Biomolecules*. – 2019. – Vol.9. – № 189. – P. 1–12.
96. Balick, M. *Rodale's 21st-Century Herbal: A practical guide for healthy living using nature's most powerful plants* / M. Balick. – Pennsylvania: Rodale Inc., 2014. – 512 p.
97. Bansal, V. P. Humoral immune responses in osteomyelitis / V. P. Bansal, P. K. Mittal, G. Ashokraj // *International Orthopaedics*. – 1992. – № 16. – P. 297–301.
98. Barrio, D.A. Vanadium and bone development: putative signaling pathways / D.A. Barrio, S.B. Etcheverry // *J. Physiol. Pharmacol.* – 2006. – Vol.84. – P. 677–686.
99. Belian, M.F. Synthesis and characterization of Cr (III), Mn (II), Fe (III), Co (II), Ni (II), Cu (II), and Zn (II) complexes with 2,6 pyridinedicarboxylic acid, chelidamic acid, and chelidonic acid / M.F. Belian, V.E. Silva, G.F. de Sa, S. Alves, R.F. de Farias // *Synthesis and reactivity in inorganic, metal-organic, and nano-metal chemistry*. – 2014. – Vol. 44. – P.1461–1463.
100. Bogdanova, L.S. Carotenoids of the lipid complex of *Gnaphalium uliginosum* / L.S. Bogdanova, M.P. Strukova, G.A. Fedorova // *Chemistry of natural compounds*. – 1983. – Vol.19. – №2. – P. 232.
101. Bonaventura, P. Zinc and its role in immunity and inflammation / P. Bonaventura, G. Benedetti, F. Albarède, P. Miossec // *Autoimmunity reviews*. – 2015. – Vol.14. – P. 277–285.
102. Chik, W.I. *Saussurea involucrata*: A review of the botany, phytochemistry and ethnopharmacology of a rare traditional herbal medicine / W.I. Chik, L. Zhu, L.L. Fan, T. Yi, G.Y. Zhu, X.J. Gou, Y.N. Tang, J. Xu, W.P. Yeung, Z.Z. Zhao, Z.L. Yu, H.B. Chen // *Journal of ethnopharmacology*. – 2015. – Vol. 172. – P. 44 – 60.
103. Choi, K.C. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-septic potential of phenolic acids and flavonoid fractions isolated from *Lolium multiflorum* / K.C. Choi, Y.O. Son, J.M. Hwang, B.T. Kim, M. Chae, J.C. Lee // *Pharmaceutical Biology*. – 2016. – Vol. 55. – P. 611–619.

104. Cui, Y. Preparation of *Lentinula edodes* polysaccharide-calcium complex and its immunoactivity / Y. Cui, H. Yan, X. Zhang // *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. – 2015. – Vol. 79. – P. 1619–1623.
105. Dan, S. Flavonoids of herba *Epimedii* enhances bone repair in a rabbit model of chronic osteomyelitis during post-infection treatment and stimulates osteoblast proliferation in vitro / S. Dan, Z. Yang, S. Lifeng, Z. Rongzong // *Phytotherapy research*. – 2017. – Vol.5. – №.31. – P. 330–339.
106. Dong-Sung, L. Pulchellamin G, an amino acid-sesquiterpene lactone, from *Saussurea pulchella* suppresses lipopolysaccharide-induced inflammatory responses via heme oxygenase-1 expression in murine peritoneal macrophages / L. Dong-Sung, C. Hyun-Gyu, W. Kyeong Wan, K. Dae-Gil, L. Ho-Sub, O. Hyuncheol, L. Kang Ro, K. Youn-Chul // *European journal of pharmacology*. – 2013. – Vol. 715. – P. 123–132.
107. Du, L. *Polygonatum sibiricum* polysaccharide inhibits osteoporosis by promoting osteoblast formation and blocking osteoclastogenesis through Wnt/ $\beta$ -catenin signalling pathway / L. Du, M. N Nong, J. M. Zhao, X. M. Peng // *Scientific reports*. – 2016. – № 6. – P. 1–12.
108. Dubois, M. Colorimetric method for determination of sugars and related substances / M. Dubois, K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P. A. Rebers, F. Smith // *Anal. Chem.* – 1956. – Vol. 28. – P. 350–356.
109. Dudareva, M. The microbiology of chronic osteomyelitis: changes over ten years / M. Dudareva, A.J. Hotchen, J. Ferguson, S. Hodgson, M. Scarborough, B.L. Atkins, M.A. McNally // *Journal of infection*. – 2019. – Vol.79. – №3. – P. 189–198.
110. Dudek, M.K. Hydroxycinnamoyl derivatives and secoiridoid glycoside derivatives from *Syringa vulgaris* flowers and their effects on the pro-inflammatory responses of human neutrophils / M.K. Dudek, B. Michalak, M. Woźniak, M.E. Czerwińska, A. Filipek, S. Granica, A.K. Kiss // *Fitoterapia*. – 2017. – Vol.121. – P. 194–205.

111. Eid, A. M. Some immunological aspects of staphylococcal haematogenous osteomyelitis / A. M. Eid, H. Eisa, A. Deif // Archives of orthopaedic and traumatic surgery. –1980. – № 96. – P. 221–224.
112. Eiji, T. Dietary phosphorus in bone health and quality of life / T. Eiji, Y. Hironori, Y.O. Hisami, T. Yutaka // Nutrition reviews. – 2012. – Vol. 70. – P. 311–321.
113. European Pharmacopoeia 6th Edition / Council of Europe European (COE) - European Directorate for the Quality of Medicines (EDQM) // Two Volumes. – 2007. – 4392 p.
114. Fantoni, M. Systemic antibiotic treatment of chronic osteomyelitis in adults / M. Fantoni, F. Taccari, F. Giovannenze // European review for medical and pharmacological sciences. – 2019. –Vol.23. – №2. – P. 258–270.
115. Ferreira, S.S. Structure-function relationships of immunostimulatory polysaccharides: a review / S.S. Ferreira, C.P. Passos, P. Madureira, M. Vilanova, M.A. Coimbra // Carbohydrate Polymers. – 2015. – Vol. 132. – P. 378–396.
116. Folwarczna, J. Effects of natural phenolic acids on the skeletal system of ovariectomized rats / J. Folwarczna, M. Zych, J. Burczyk, H. Trzeciak, I. Henryk, H.I. Trzeciak // Planta Medica. – 2009. – Vol. 75. – P. 1567–1572.
117. Folwarczna, J. Effects of caffeic and chlorogenic acids on the rat skeletal system / J. Folwarczna, M. Pytlik, M. Zych, U. Cegiela // European Review for Medical and Pharmacological Sciences. – 2015. – №19. – P. 682–693.
118. Forrest, H.N. Boron and fish oil have different beneficial effects on strength and trabecular microarchitecture of bone / H.N. Forrest, J.S. Barbara // Journal of trace elements in medicine and biology. – 2009. – Vol. 23. – P. 195–203.
119. Fung, F.M. Extraction, separation and characterization of endotoxins in water samples using solid phase extraction and capillary electrophoresis-laserinduced fluorescence / F.M. Fung, M. Su, H.T. Feng, S.F.Y. Li // Scientific reports. – 2017. –Vol.7. – P.1–10.

120. Geurts, J. Treatment strategies for chronic osteomyelitis in low- and middle-income countries: systematic review / J. Geurts, A. Hohnen, T. Vranken, P. Moh // *Tropical medicine & international health*. – 2017. – Vol. 22. – №9. – P. 1054–1062.
121. Green, L.C. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids / L.C. Green, D.A. Wagner, J. Glogowski, P.L. Skipper, J.S. Wishnok, S.R. Tannenbaum // *Analytical Biochemistry*. – 1982. – Vol.126. – P. 131–138.
122. Hari, M. D. Ferulic acid, a dietary polyphenol suppresses osteoclast differentiation and bone erosion via the inhibition of RANKL dependent NF-κB signalling pathway / M. D. Hari, S. Snigdha, G. Ramamoorthi, R. Mahaboobkhan // *Life sciences*. – 2018. – Vol.207. – P. 284–295.
123. Hisashi, M. Effects of sesquiterpenes and amino acid–sesquiterpene conjugates from the roots of *Saussurea lappa* on inducible nitric oxide synthase and heat shock protein in lipopolysaccharide activated macrophages / M. Hisashi, T. Iwao, N. Kiyofumi, K. Tadashi, M. Toshio Y. Masayuki // *Bioorganic & medicinal chemistry*. – 2003. – Vol. 11. – P. 709–715.
124. Horcajada, M.N. Naturally plant-derived compounds: role in bone anabolism / M.N. Horcajada, E. Offord // *Current molecular pharmacology*. – 2012. – Vol.5. – P. 205–218.
125. Ibiza, S. The role of nitric oxide in the regulation of adaptive immune responses / S. Ibiza, J.M. Serrador // *Inmunología*. – 2008. – № 27. – P. 103–117.
126. Iserin, P. *Encyclopédie des plantes médicinales* / P. Iserin, M. Masson, J.P. Restellini, E. Ybert. – Paris: Larousse, 2001. – 335 p.
127. Jiaju, Z. *Encyclopedia of Traditional Chinese Medicines. Molecular structures, pharmacological activities, natural sources and applications* / Z. Jiaju, X. Guirong, Y. Xinjian. – Berlin: Springer-Verlag Berlin, 2011. – Vol.1. – 590 p.
128. Jiaju, Z. *Encyclopedia of Traditional Chinese Medicines. Molecular structures, pharmacological activities, natural sources and applications* / Z. Jiaju, X. Guirong, Y. Xinjian. – Berlin. Springer-Verlag Berlin, 2011. – Vol.4. – 669 p.

129. Jong, H.L. p-Coumaric acid stimulates longitudinal bone growth through increasing the serum production and expression levels of insulin-like growth factor 1 in rats / H.L. Jong, H.C.Yoon, H.K. Ho, S.B. Joon, W.J. Tae, P. Taekwang, P. Jinwoo, K.S. Uiseok, L. Hoon, H. J. Ji // *Biochemical and biophysical research communications*. – 2018. – Vol. 505. – P. 1103–1106.
130. Jun-Li, Y. Phytochemicals and biological activities of *Saussurea* species / Y. Jun-Li, W. Rui, L. Lei-Lei, S. Yan-Ping // *Journal of Asian natural products research*. – 2010. – Vol. 12. – P. 162–175.
131. Khlusov, I. Comparative in vitro evaluation of antibacterial and osteogenic activity of polysaccharide and flavonoid fractions isolated from the leaves of *Saussurea controversa* / I. Khlusov, E. Avdeeva, V. Shupletsova, O. Khaziakhmatova, L. Litvinova, E. Porokhova, Ya. Reshetov, I. Zvereva, L. Mushtovatova, M. Karpova, A. Guryev, I. Sukhodolo, M. Belousov // *Molecules*. – 2019. – Vol.24. – № 20. – P. 1–15.
132. Kilani-Jaziri, S. Immunomodulatory and cellular anti-oxidant activities of caffeic, ferulic, and p-coumaric phenolic acids: a structure-activity relationship study / S. Kilani-Jaziri, I. Mokdad-Bzeouich, M. Krifa, N. Nasr, K. Ghedira, L. Chekir-Ghedira // *Drug Chem. Toxicol.* – 2017. – №40. – P. 416–424.
133. Krasnov, E.A. The composition of biological active substances and pharmacological activity of perspective species flora of Siberia: тез. докл. науч. конф. «Современные достижения в химии природных соединений и биотехнологии» / E.A. Krasnov, E. Yu. Avdeeva, Y.V. Gorina, E.Yu. Sherstoboev. – Новосибирск, 2012. – С. 37.
134. Kuriya, K. Antiosteoporotic effects of acer palmatum extract on osteoclastogenesis and osteoblastogenesis / K. Kuriya, M. Nishio, S. Wada, H. Katsuzaki, M. Nishise, H. Okamoto, H. Umekawa // *Journal of medicinal food*. – 2019. – Vol.22. – №4. – P. 1–9.
135. Kuroyanagi, G. Epigallocatechin gallate synergistically potentiates prostaglandin E<sub>2</sub>-stimulated osteoprotegerin synthesis in osteoblasts / G. Kuroyanagi, H.

- Tokuda, N. Yamamoto, S. Kainuma // *Prostaglandins Other Lipid mediat.* – 2017. – Vol. 129 – P. 27–33.
136. Li, X., Deproteinization of polysaccharide from the *Stigma Maydis* by Sevag method / X. Li, R. Zhao, H.L. Zhou, D.H. Wu // *Advanced materials research.* – 2012. – Vol. 340. – P. 416–420.
137. Lima, A.L.L. Recommendations for the treatment of osteomyelitis / A.L.L. Lima, P. R. Oliveira, V.C. Carvalho, S. Cimerman, E. Savio // *The Brazilian journal of infectious diseases.* – 2014. – Vol.18. –№5. – P. 526–534.
138. Lingyun, Y. Composition and antioxidant activity of the polysaccharides from cultivated *Saussurea involucrata*. / Y. Lingyun, Z. Qingsheng, X. Jie, S. Jian, Y. Xiaofan, Z. Bing, S. Huiming, N. // *Shengming International journal of biological macromolecules.* – 2012. – Vol.50. – P. 849–853.
139. Liu, H. Anti-inflammatory activities and potential mechanisms of phenolic acids isolated from *Salvia miltiorrhiza* f. *alba* roots in THP-1 macrophages / H. Liu, S. Ma, H. Xia, H. Lou, F. Zhu, L. Sun // *Journal of ethnopharmacology.* – Vol. 222. – P. 201–207.
140. Mihaylova, D. Carotenoids, tocopherols, organic acids, carbohydrate and mineral content in different medicinal plant extracts / D. Mihaylova, R. Vrancheva, N. Petkova, M. Ognyanov, I. Desseva, I. Ivanov, M. Popova, A. Popova // *Zeitschrift für naturforschung C.* – 2018. – Vol. 73. – №11. – P. 439–448.
141. Moodie, R.L. Studies in paleopathology. Pleistocene examples of traumatic osteomyelitis / R.L. Moodie // *Ann. Med. Rist.* – 1926. – №19. – P. 413–418.
142. Mosmann, T.R. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties / T.R. Mosmann, R.L. Coffman // *Annu Rev Immunol.* – 1989. – Vol. 7. – P. 145–173.
143. Niu, W. Starch-derived absorbable polysaccharide hemostat enhances bone healing via BMP-2 protein / W. Niu, Y. Wang, Y. Liu, B. Zhang // *Acta Histochem.* – 2017. – №.119. – P. 257 – 263.

144. Pandey, M. M. *Saussurea costus*: botanical, chemical and pharmacological review of an ayurvedic medicinal plant / M. M. Pandey, S. Rastogi, A. K. S. Rawat // *Journal of ethnopharmacology*. – 2007. – Vol. 110. – P. 379–390.
145. Peters, K. M. Alteration in the pattern of macrophage subtypes in chronic osteomyelitis compared with acute joint infection / K. M. Peters, K. Koberg, T. Rosendahl, W. Schmutzler // *International orthopaedics*. – 1995. – № 19. – P. 162 – 166.
146. Rammal, H. Combining calcium phosphates with polysaccharides: a bone-inspired material modulating monocyte/macrophage early inflammatory response / H. Rammal, C. Bour, M. Dubus, L. Entz, L. Aubert, S. C. Gangloff, S. Audonnet, N.B. Bercu, F. Boulmedais, C. Mauprivez, H. Kerdjoudj // *International journal of molecular sciences*. – 2018. – Vol.19. – P. 1–13.
147. Rovkina, K.I. Water-Soluble Polysaccharides of Alfalfa (*Medicago sativa* (Fabaceae)) of Flora of Krasnoyarsk Krai / K.I. Rovkina, S.V. Krivoshchekov, A.M. Guryev, M.S. Yusubov, M.V. Belousov // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2018. – Vol. 44. – № 7. – P. 854–859.
148. Shikov, A. N. Medicinal Plants of the Russian Pharmacopoeia, history and applications / A. N. Shikov, O. N. Pozharitskaya, V. G. Makarov, H. Wagner, R. Verpoorte, M. Heinrich // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2014. – Vol.154. – P. 481–536.
149. Shurupova, M.N. Population structure, resource potential and diagnostic features of raw materials of *Saussurea controversa* DC. / M.N. Shurupova, E.P. Parshina, Ya. E. Reshetov, A.A. Krasnobaeva, E.Yu. Avdeeva, M. V. Belousov // *Tomsk State University journal of biology*. – 2019. – Vol.45. – P.34–46.
150. Song, Y.R. Enzyme-assisted extraction, chemical characteristics, and immunostimulatory activity of polysaccharides from Korean ginseng (*Panax ginseng* Meyer) / Y.R. Song, S.K. Sung, M. Jang, T.G. Lim, C.W. Cho, C. J. Han, H. D. Hong // *International journal of biological macromolecules*. – 2018. – Vol. 116. – P. 1089–1097.

151. Suleimen, E. M. Constituent Composition of Essential Oil from *Saussurea pulchella* / E. M. Suleimen, Z. A. Ibataev, P. G. Gorovoi, R. V. Dudkin, K. A. Aubakirov, A. A. Tlepov, S. A. Ross // *Chemistry of Natural Compounds*. – 2016. – Vol. 52. – №6. – P. 1127–1128.
152. Suzuki, R. Screening for natural medicines effective for the treatment of osteoporosis / R. Suzuki, S. Fukami, M. Tomomura, A. Tomomura, Y. Shirataki // *Journal of natural medicines*. – 2019. – Vol.73. – №1. – P.331–337.
153. Ting, Z. Chemical constituents from the genus *Saussurea* and their biological activities / Z. Ting, L. Shao – Jing, Z. Zhao – Xin, Z. Man – Li, S. Qing – Wen, G. Yu – Cheng // *Heterocyclic communications*. – 2017. – Vol.23. – P.1–28.
154. Troshchenko, A. T. Investigation of the chemical composition of *Saussurea Frolovii* Ldb. / A. T. Troshchenko, V. S. Kobrin // *Khimiya Prirodnikh Soedinenii*. – 1965. – Vol. 1. – №4. – P. 286–262.
155. Waksmundzka-Hajnos, M. *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry* / M. Waksmundzka-Hajnos, J. Sherma, T. Kowalska. – New York: CRC Press, 2008. – 874 p.
156. Wang, S.J. Anti-inflammatory activity of myricetin isolated from *Myrica rubra* Sieb. et Zucc. leaves / S.J. Wang, Y. Tong, S. Lu, R. Yang, X. Liao, Y. F. Xu, X. Li // *Planta Medica*. – 2010. – Vol. 76. – P. 1492–1496.
157. Wenbo, C. Two novel polysaccharides from the torus of *Saussurea laniceps* protect against AAPH-induced oxidative damage in human erythrocytes / C. Wenbo, M. Juanjuan, G. Fan, X. Hongru, Z. Qiping, L. Xiaofeng, W. Fashan, W. Hui, L. Furao // *Carbohydrate Polymers*. – 2018. – Vol. 200. – P. 446–455.
158. Wozniak, M. Effects of phytochemically characterized extracts from *Syringa vulgaris* and isolated secoiridoids on mediators of inflammation in a human neutrophil model / M. Wozniak, B. Michalak, J. Wyszomierska, M.K. Dudek, A.K. Kiss // *Front. Pharmacol.* – 2018. – Vol. 9. – P. 1–15.
159. Xu, H. Tea polysaccharide inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells and ameliorates ovariectomy-induced osteoporosis in rats / H. Xu, D.

- Yin, T. Liu, F. Chen, Y. Chen, X. Wang, J. Sheng // *Biomedicine & pharmacotherapy*. – 2018. – Vol. 102. – P. 539 – 548.
160. Yahfoufi, N. The immunomodulatory and anti-inflammatory role of polyphenols / N.Yahfoufi, N. Alsadi, M. Jambi, C. Matar // *Nutrients*. –2018. – Vol.10. – P. 1–23.
161. Yamaguchi, M. Effects of flavonoid on calcium content in femoral tissue culture and parathyroid hormone-stimulated osteoclastogenesis in bone marrow culture in vitro / M. Yamaguchi, R. Hamamoto, S. Uchiyama, K. Ishiyama // *Molecular and cellular biochemistry*. –2007. – Vol.303. – P. 83–88.
162. Yamamoto, N. Amplification by (-)-epigallocatechin gallate and chlorogenic acid of TNF- $\alpha$ -stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblasts /N. Yamamoto, H. Tokuda, G. Kuroyanagi, S. Kainuma // *Int. J. Mol.Med*. –2015. – Vol.11 – P. 1707 – 1712.
163. Yang, L.C. Structural characterization of an immunostimulating polysaccharide from the stems of a new medicinal *Dendrobium* species: *Dendrobium taiseed tosnobile* / L.C. Yang, C.C. Hsieh, C.L. Wen, C.H. Chiu, W.C. Lin // *International journal of biological macromolecules*. – 2017. – Vol.103. – P.1185–1193.
164. Yi, T. Comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of three medicinal plants known as «Snow Lotus» herb in traditional Uighur and Tibetan medicines /T. Yi, Z.Z. Zhao, Z.L. Yu, H.B. Chen // *Journal of Ethnopharmacology*. – 2010. –Vol. 128. – P. 405–411.
165. Yu-Fang, W. Secondary metabolites of plants from the genus *Saussurea*: chemistry and biological activity / W. Yu-Fang, N. Zhi-Yu, D. Mei, C. Bin, S. Qing-Wen, G. Yu-Cheng, K. Hiromasa // *Chemistry & Biodiversity*. – 2010. – Vol. 7. – P. 2623–2659.
166. Ze, G. In vivo and in vitro immunomodulatory and anti-inflammatory effects of total flavonoids of *astragalus* / G. Ze, X. Hong-Yan, X. Lu, W. Sha-Sha, Z. Xue-Mei // *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines*. – 2016. – Vol. 13. – № 4. – P.60–73.

167. Zekovića, Z. Chemical and biological screening of stinging nettle leaves extracts obtained by modern extraction techniques / Z. Zekovića, A. Cvetanovića, J. Švarc-Gajića, S. Gorjanovića, D. Sužnjevića, P. Maškovića, S. Savića, M. Radojkovića, S. Đurovića // *Industrial Crops & Products*. – 2017. – Vol. 108. – P. 423–430.
168. Zhang, Y. Puerarin prevents LPS-induced osteoclast formation and bone loss via inhibition of akt activation / Y. Zhang, M. Yan, Q.F. Yu, P.F. Yang // *Biol. Pharm. Bull.* – 2016. – № 39. – P. 2028–2035.
169. Zhang, M. Mechanism of chlorogenic acid treatment on femoral head necrosis and its protection of osteoblasts / M. Zhang, X. Hu // *Biomedical reports*. – 2016. – Vol.5. – №2. – P. 682–693.
170. Zhou, R.P. Chlorogenic acid prevents osteoporosis by Shp2/PI3K /Akt pathway in ovariectomized rats / R.P. Zhou, S.J. Lin, W. B. Wan, H.L. Zuo // *Plos one*. – 2016. – №.12. – P. 1–19.

## **ПРИЛОЖЕНИЕ № 1**

Проект фармакопейной статьи

на листья *S. controversa* DC.

Пояснительная записка.

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ  
ФЕДЕРАЦИИ

ФАРМАКОПЕЙНАЯ СТАТЬЯ

---

Соссюреи спорной листья

ФС

*Saussureae controversae folia*

Вводится впервые

---

Собранные в течение фазы цветения, высушенные розеточные и стеблевые листья дикорастущего многолетнего травянистого растения соссюреи спорной – *Saussurea controversa* DC., сем. Астровых – *Asteraceae*.

ПОДЛИННОСТЬ

Описание. *Цельное сырье*. Смесь цельных или частично измельченных простых черешковых и сидячих листьев. Листья яйцевидные либо продолговато – яйцевидные длинночерешковые, длиной от 5 до 12 см, шириной от 2,0 до 9 см, широкие, основание глубокосердцевидное, край неравнозубчатый. Верхние листья – удлинненно - ланцетовидной формы, тупые при основании. Жилкование сетчатое, нижние стороны всех листьев густоопушены, опушение беловойлочное. Цвет листьев с верхней стороны от светло-зеленого до темно-зеленого, с нижней – серовато-белый.

Черешки листьев зеленые длиной от 3 до 10 см, в сечении имеют треугольную форму, по центру фиолетового или серо-фиолетового цвета.

При рассмотрении сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видно, что нижняя сторона листа покрыта длинными белыми спутанными волосками, формирующими беловойлочное опушение. На верхнем эпидермисе, волоски отсутствуют. Цвет верхней части листьев от светло- до темно-зеленого, нижней части – белесый. Запах специфический. Вкус водного извлечения горький.

*Измельченное сырье.* Смесь кусочков листьев и черешков, и их рыхлые агрегаты, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 6 мм. Цвет измельченного сырья от светло- до темно-зеленого.

При рассмотрении сырья под лупой (10×) или стереомикроскопом (16×) видны кусочки листьев, иногда с неравнозубчатыми краями, с многочисленными спутанными белыми волосками, шаровидные рыхлые агрегаты с кусочками листьев на поверхности и волосками внутри. Присутствуют обломки черешков фиолетового и зеленого цвета.

Запах специфический, вкус водного извлечения горький.

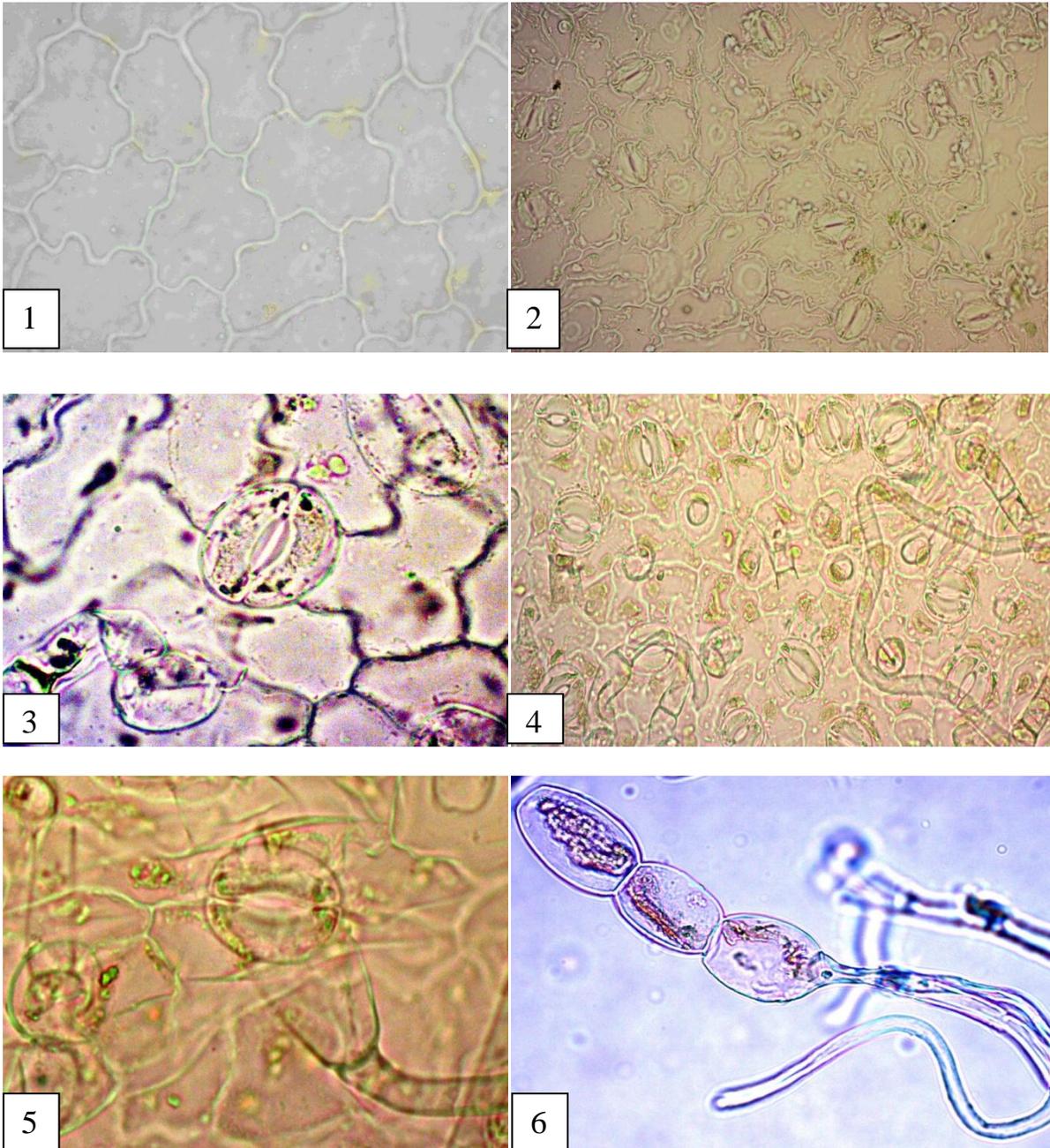
***Микроскопические признаки.*** *Цельное сырье, измельченное сырье.* При рассмотрении с поверхности эпидермиса адаксиальной стороны листовой пластинки видны внешние многоугольные, неравномерно утолщенные, округлые, зигзагообразные стенки клеток, покрытые толстым слоем морщинистой кутикулы.

Клетки эпидермиса абаксиальной стороны листовой пластинки треугольные, четырехугольные и многоугольные с сильноизвилистыми, зигзагообразными тонкими стенками. Клетки нижнего эпидермиса в 3-4 раза меньше клеток верхнего эпидермиса. Устьица крупные, овально вытянутые и округлые, окружены 4-6 околоустьичными клетками - аномоцитный тип устьичного аппарата. Устьица находятся на поверхности, некоторые погруженные в эпидермис, расположены на нижней стороне листовой пластинки – гипостоматический лист. Устьичный индекс  $25,8 \pm 0,6\%$ .

На поперечном срезе листа виден однорядный мезофилл, представленный палисадным и 5-6-рядным губчатым мезофиллом, в губчатом мезофилле имеются хорошо выраженные межклетники.

Верхняя сторона листа голая, нижняя густоопушена длинными 2-3 клеточными бичевидными волосками, состоящими из двух маленьких клеток бочонковидной или пьедестальной формы в основании и третьей основной длиной. На нижнем эпидермисе листа также присутствуют двух-

трехклеточные головчатые волоски и четырехклеточные волоски, с тремя округлыми бочонковидными клетками в основании и одной верхушечной длинной бичевидной клеткой. На поперечном срезе центральной жилки листа, видны 5-7 коллатеральных проводящих пучков закрытого типа. С верхней и нижней стороны пучков, присутствуют тяжи склеренхимы. Главная жилка листа по нижней стороне усилена колленхимой.



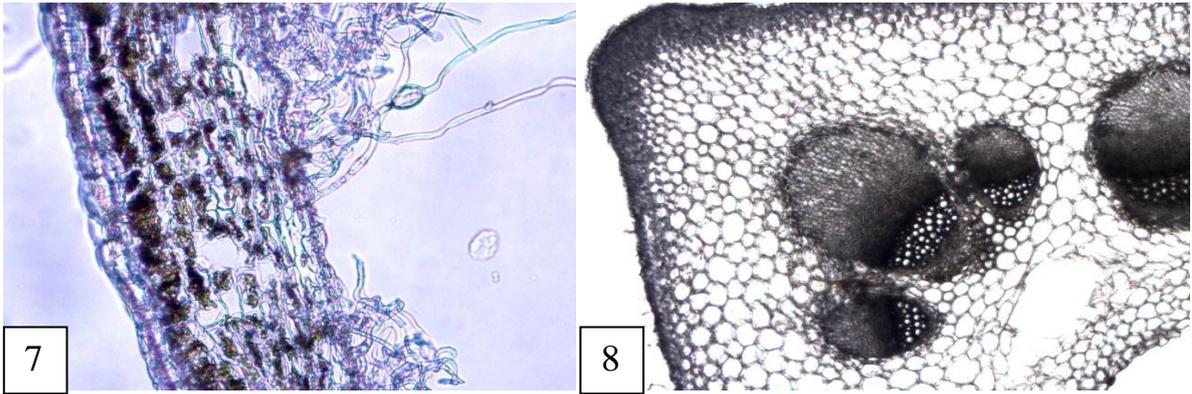


Рисунок – Сосюреи спорной листья

1 – вытянутые и округлые многоугольные клетки верхнего эпидермиса с неравномерно утолщенными стенками ( $\times 20$ ); 2 – нижний эпидермис с устьичным комплексом из 4 – 5 клеток (аномоцитный тип), ( $\times 40$ ); 3 – трехклеточный головчатый волосок, устьице ( $\times 100$ ); 4 – трехклеточный бичевидный волосок, пьедестальные клетки в основании фрагментов бичевидных волосков ( $\times 40$ ); 5 – пьедестальная клетка в основании фрагмента бичевидного волоска ( $\times 100$ ); 6 – четырехклеточный волосок, с тремя округлыми бочонковидными клетками в основании и одной верхушечной длинной бичевидной клеткой ( $\times 40$ ); 7 – 5-6-рядный губчатый мезофилл, с межклетниками на поперечном срезе листа ( $\times 10$ ); 8 – закрытые проводящие пучки и уголкового колленхима на поперечном срезе черешка листа ( $\times 10$ ).

### Определение основных групп биологически активных веществ

#### *Качественные реакции*

Аналитическую пробу сырья массой 1,0 г (т.н.), измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3-6 мм помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, экстрагируют 15 мл 40% этанолом трижды по 60 мин на водяной бане при температуре 80 °С. Извлечения объединяют и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят 40% этанолом до метки и перемешивают (раствор А).

а) Подлинность растительного сырья по наличию хелидоновой кислоты устанавливается при ее количественном определении методом ВЭЖХ. На хроматограмме испытуемого раствора (раствор А) должен наблюдаться пик с временем удерживания хелидоновой кислоты

б) 25 мл аликвоты раствора А, упаривают до 5 мл, к полученному раствору прибавляют 20 мл 96% этанола и перемешивают, должны появляться хлопьевидные сгустки выпадающие в осадок при стоянии (полисахариды)

в) К 5 мл раствора А прибавляют 5 мл 5% этанольного раствора хлорида алюминия, 0,3 мл концентрированной хлороводородной кислоты – наблюдают образование комплекса желтого цвета (флавоноиды).

## ИСПЫТАНИЯ

**Потеря в массе при высушивании.** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 9 %.

**Зола общая.** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 14 %.

**Зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте.** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 0,3 %.

**Измельченность сырья.** *Цельное сырье:* измельченных частиц проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, не более 3%. *Измельченное сырье:* частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 4 мм, – не более 40%; частиц проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм – не более 5%.

**Посторонние примеси.**

**Листья черно-зеленые и желто-зеленые.** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 4,0%.

**Органическая примесь.** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1,5%.

**Минеральная примесь.** *Цельное сырье, измельченное сырье* – не более 1,0 %.

**Тяжелые металлы и мышьяк.** В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания тяжелых металлов и мышьяка в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

**Радионуклиды.** В соответствии с требованиями ОФС «Определение содержания радионуклидов в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах».

**Микробиологическая чистота.** В соответствии с требованиями ОФС «Микробиологическая чистота».

**Количественное определение.** *Цельное сырье, измельченное сырье:* содержание хелидоновой кислоты, не менее 3 %; суммы флавоноидов в пересчете на рутин, не менее 0,8 %; суммы полисахаридов, не менее 4 %.

**Хелидоновая кислота.** Приготовление стандартного раствора хелидоновой кислоты: 0,0125 г (точная навеска) хелидоновой кислоты помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и растворяют в стартовой подвижной фазе, состоящей из 0,1 %-ого раствора трифторуксусной кислоты в воде и 0,1 %-ого раствора трифторуксусной кислоты в ацетонитриле (95:5), полученный раствор доводят до метки тем же растворителем. Аликвоту 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объем колбы до метки тем же растворителем.

Аликвоты по 20 мкл раствора А и стандартного раствора хелидоновой кислоты хроматографируют в следующих условиях: колонка 25 × 4,6 см, Luna C18(2), 5 мкм, Phenomenex; подвижная фаза – элюент А: 0,05 % ТФУ в воде; элюент Б – 0,05 % ТФУ в ацетонитриле; режим элюирования – градиентный: 0-5 мин. – 5-10 % Б; 5-10 мин. – 10-100 % Б; 10-15 мин. – 100% Б; 15-20 мин. – 5 % Б; скорость потока: 1,0 мл/мин; температура колонки: 40 °С; детектор: УФ-спектрофотометрический или диодно-матричный, 220 нм; время регистрации хроматограмм: 20 мин.

Расчет содержания хелидоновой кислоты в пересчете на абсолютно сухое растительное сырье проводят по формуле:

$$X(\%) = \frac{S \times m_0 \times 4}{a \times S_0 \times (100 - w)}$$

где,  $S$  – площадь пика хелидоновой кислоты на хроматограмме раствора  $A$ ,  $\text{mAU} \times \text{min}$ ;

$S_0$  – площадь пика на хроматограмме стандартного раствора,  $\text{mAU} \times \text{min}$ ;

$m_0$  – масса навески РСО хелидоновой кислоты, мг;

$a$  – масса навески растительного сырья, г.

$w$  – потеря в массе при высушивании, %

**Флавоноиды.** Для определения содержания флавоноидов 5 мл раствора  $A$  помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл 5% этанольного раствора хлорида алюминия, 0,3 мл концентрированной хлороводородной кислоты и доводят 95% этанолом до метки. Оптическую плотность измеряют на спектрофотометре при длине волны 410 нм через 60 мин. Параллельно измеряют оптическую плотность раствора стандартного образца рутина. Для этого 1 мл 0,02% раствора рутина-стандарта помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляют 5 мл 5% этанольного раствора хлорида алюминия, 0,3 мл концентрированной хлороводородной кислоты и доводят до метки 95% этанолом.

Приготовление раствора ГСО рутина: 0,0050 г (точная навеска) ГСО рутина, высушенного до постоянной массы при температуре 100-105°C, растворяют в мерной колбе вместимостью 25 мл в небольшом количестве подогретого 95% этанола и доводят объем до метки тем же растворителем.

Расчет содержания суммы флавоноидов в пересчете на рутин (%) осуществляют по формуле:

$$X\% = \frac{A \cdot M_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot M \cdot 5 \cdot 25 \cdot 25 \cdot (100 - w)} = \frac{A \cdot M_0 \cdot 8000}{A_0 \cdot M \cdot (100 - w)}$$

Где,  $A$  – оптическая плотность испытуемого раствора.

$A_0$  – оптическая плотность ГСО рутина (среднее из трех измерений).

$M_0$ —масса ГСО рутина, г.

$M$ —масса навески сырья, г.

$W$ — потеря в массе при высушивании, %.

**Полисахариды.** Для определения содержания полисахаридов 25 мл аликвоты раствора А упаривают до 5 мл, прибавляют 20 мл 96% этанола, отстаивают в течение 15 минут, осадок переносят на предварительно взвешенный бумажный фильтр в воронке Бюхнера, промывают 15 мл 96% этанола, затем фильтр сушат до постоянной массы и взвешивают. Расчет содержания полисахаридов проводят по следующей формуле:

$$X\% = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot V_{\text{аликвоты}} \cdot (100 - w)}$$

Где  $m$  — масса навески сырья, г.

$m_1$ — масса фильтра, г.

$m_2$ — масса фильтра с осадком, г.

$w$ — потеря в массе при высушивании, %.

**Упаковка, маркировка и транспортирование.** В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

**Хранение.** В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

## Пояснительная записка

### к проекту Фармакопейной статьи “Соссюреи спорной листья”

Настоящий проект Фармакопейной статьи “Соссюреи спорной листья” составлен на кафедре фармацевтического анализа Сибирского государственного медицинского университета. Проект оформлен в соответствии с требованиями ОСТ 91500.05.001-00 «Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения» и МР 64-03-004-2004 «Графическое оформление лекарственных средств. Общие требования».

Производящее растение *Saussurea controversa* DC. относится к роду *Saussurea* DC., семейство Астровые (Asteraceae). *S. controversa* представляет собой бореально-монтанный урало-сибирский вид с дизъюктивным ареалом. Часть ареала расположена на территории Среднего Урала и Пермского края. Сибирская часть ареала охватывает юго-восток Западной Сибири (Томская область, Новосибирская область, Кемеровская область, Республика Алтай), и юг Восточной Сибири. Обитает преимущественно в лесной области на лугово-степных, щебнистых, каменистых склонах разной экспозиции, в лесах, на лугах, иногда поднимается до субальпийского пояса. Часто произрастает на карбонатизированных и кальцифицированных почвах, на выходах известняка [7, 12].

*S. controversa* относится к моноцентрическим многолетним травянистым короткостержнекорневым растениям с розеточными вегетативными и удлиненными генеративными побегами. В онтогенезе выделены 4 периода – латентный, прегенеративный, генеративный и постгенеративный, и 9 онтогенетических состояний растения – проростки, ювенильное, имматурное, виргинильное, молодое генеративное, средневозрастное или зрелое, старое генеративное, субсенильное и сенильное [16].

В ценопопуляциях *S. controversa* преобладают виргинильные особи. Возраст виргинильной особи составляет, как правило, 3 года.

Продолжительность онтогенеза *S. controversa* составляет приблизительно 7–8 лет. Периодичность заготовки должна составлять не менее чем 3–4 года, при этом заготавливать рекомендуем 25 % виргинильных особей популяции. То есть 1 раз в 3–4 года с ключевого участка можно получить 14 кг сухого сырья [16]. *S. controversa* относится к 3 категории ресурсных видов, для заготовки которых необходимо четкое соблюдение режима рационального использования [11]. Сырье *S. controversa* также можно получать в культуре, поскольку результаты многолетнего интродукционного эксперимента с этим видом проведённого в Сибирском ботаническом саду Томского государственного университета, свидетельствуют о возможности его успешного выращивания в условиях юга Томской области [10].

Таким образом, ввиду особенностей габитуса, в частности, преобладания виргинильных – розеточных, бесстебельных особей, к заготовке в качестве сырья предлагаются листья *S. controversa*.

Цельное сырье представляет собой смесь цельных или частично измельченных простых черешковых и сидячих листьев. Листья яйцевидные либо продолговато – яйцевидные длинночерешковые, длиной от 8 до 12 см, шириной от 2,5 до 9 см, широкие, основание глубокосердцевидное, край неравнозубчатый. Верхние листья – сидячие, удлинено - ланцетовидной формы, тупые при основании. Жилкование сетчатое, нижние стороны всех листьев густоопушены, опушение беловойлочное. Цвет листьев с верхней стороны от светло-зеленого до темно-зеленого, с нижней – серовато-белый. Черешки листьев зеленые длиной от 3 до 10 см, в сечении имеют треугольную форму. Запах специфический. Вкус водного извлечения горький.

Измельченное сырье представляет собой смесь кусочков листьев и черешков, и их рыхлые агрегаты, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 6 мм. Цвет измельченного сырья от светло-зеленого до темно-зеленого. Запах специфический, вкус водного извлечения горький.

Анатомическое строение листовой пластинки *S. controversa* свидетельствует о процессах ксерофитизации. Листья гипостоматические, дорсовентральные, с нижней стороны густо опушены кроющими волосками. Внешние стенки клеток адаксиального эпидермиса листа многоугольные, неравномерно утолщены, имеют вытянутую, округлую, зигзагообразную форму и покрыты толстым слоем морщинистой кутикулы (рис. 1-2). Мезофилл одноклеточный хорошо выражен, представлен палисадным и 5-6-рядным губчатым мезофиллом, при этом в губчатом мезофилле имеются хорошо выраженные межклетники (рис. 2).

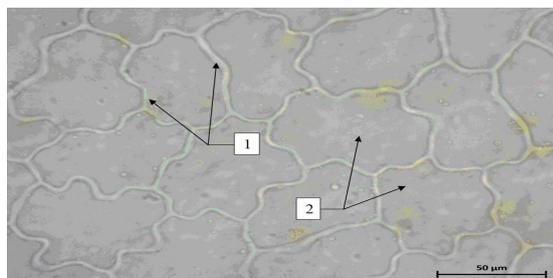


Рисунок 1 – Фрагмент плоскостного препарата листа (верхний эпидермис, ув.х20): 1 – зигзагообразные клетки с неравномерными утолщенными клетками, 2 – многоугольные клетки эпидермиса

Нижний эпидермис листа состоит из треугольных, четырехугольных и многоугольных клеток с сильноизвилистыми, зигзагообразными тонкими стенками. Устьица окружены 4-6 околоустьичными клетками - аномоцитный тип и располагаются на поверхности, кроме того, встречаются погруженные в эпидермис (рис. 3).

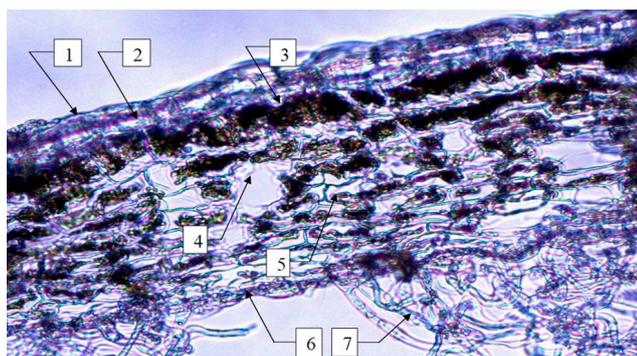


Рисунок 2 – Фрагмент поперечного среза листа (ув.х10): 1 – кутикула, 2 – адаксиальный эпидермис, 3 – палисадный мезофилл, 4 – межклетник, 5 – губчатый мезофилл, 6 – абаксиальный эпидермис, 7 – крючковые волоски.

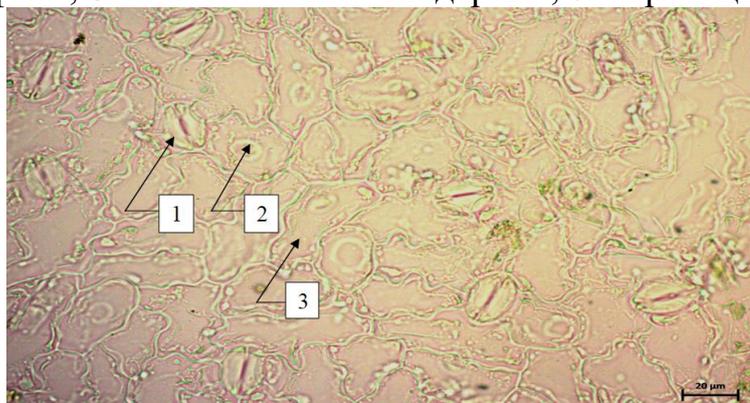


Рисунок 3 – Фрагмент плоскостного препарата листа (нижний эпидермис, ув.х40): 1 – устьице, 2 – околоустьичные клетки, 3 – эпидермальные клетки.

Для более достоверной идентификации наряду с анатомическими признаками использовали стоматографические, а именно, устьичный индекс, являющийся видоспецифичным. Под устьичным индексом понимают отношение количества устьиц к количеству эпидермальных клеток на единицу площади [9].

Устьичный индекс ( $U_i$ ) рассчитывали по формуле:

$$U_i = N_u \times 100\% / (N_{ne} + N_u),$$

где  $N_u$  – число устьиц на единице площади,  $N_{ne}$  – число основных клеток нижней эпидермы на единице площади.

Клетки нижнего эпидермиса в 3-4 раза меньше клеток верхнего эпидермиса (рис. 4). На нижнем эпидермисе присутствуют устьица двух форм: преимущественно вытянутые, в меньшей степени встречаются

округлые. Размер устьиц: средняя длина  $24,8 \pm 2,3$  мкм; средняя ширина  $18,1 \pm 2,9$  мкм. Устьичный индекс составил  $25,8 \pm 0,6\%$ .

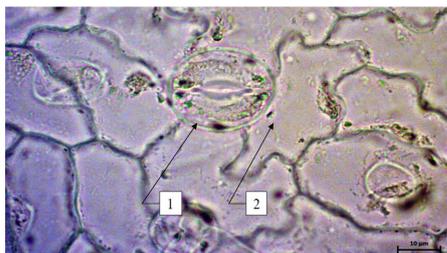


Рисунок 4 – Фрагмент плоскостного препарата листа (нижний эпидермис, ув.х60): 1 – устьице, 2 – околоустьичные клетки.

На эпидермисе нижней стороны листа присутствует беловойлочное опушение с наличием волосков трех типов. Первый тип - двух-трехклеточные головчатые волоски (рис. 5);



Рисунок 5 – Фрагмент плоскостного препарата листа (нижний эпидермис, ув.х100): 1 – трехклеточный головчатый волосок, 2 – устьице.

Второй тип - длинные 2-3 клеточные, бичевидные, состоящие из двух маленьких клеток бочонковидной или пьедестальной формы в основании и третьей основной длинной. Эти волоски составляют основную массу опушения на нижнем эпидермисе (рис. 6-8).

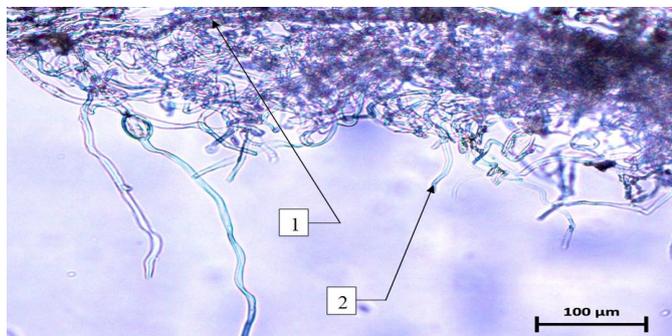


Рисунок 6 – Фрагмент поперечного среза листа с кроющими волосками (ув.х10): 1 – нижний эпидермис, 2 – трехклеточные бичевидные волоски

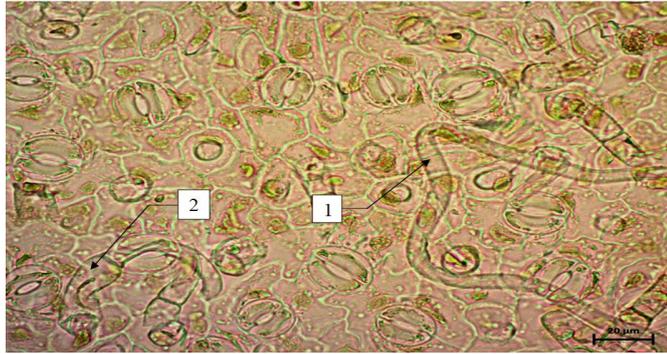


Рисунок 7 – Фрагмент плоскостного препарата листа (нижний эпидермис, ув.х40): 1 – трехклеточный бичевидный волосок, 2 – пьедестальная клетка в основании фрагмента бичевидного волоска.

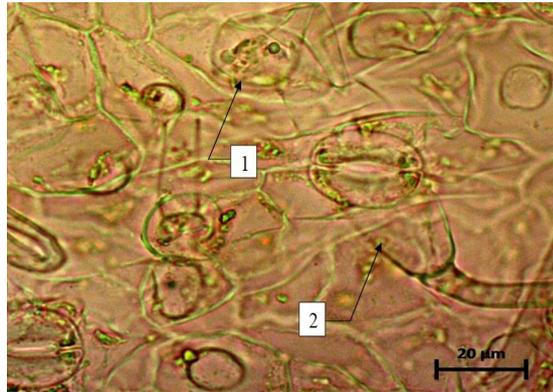


Рисунок 8 – Фрагмент плоскостного препарата листа (нижний эпидермис, ув.х100): 1 – двухклеточный головчатый волосок, 2 – пьедестальная клетка в основании фрагмента бичевидного волоска.

Третий тип – четырехклеточные волоски, с тремя округлыми бочонковидными клетками в основании и одной верхушечной длинной бичевидной клетки (рис. 9).

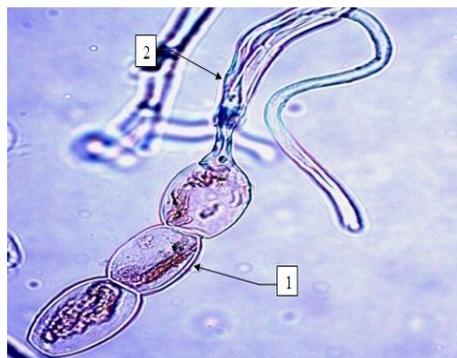


Рисунок 9 – Фрагмент препарата волоска (нижний эпидермис, ув.х40): 1 – округлые бочонковидные клетки, 2 – бичевидная клетка.

На поперечном срезе центральной жилки листа видны 5-7 коллатеральных проводящих пучков открытого типа. С верхней и нижней стороны пучков,

присутствуют хорошо выраженные тяжи склеренхимы. Главная жилка листа по нижней стороне усилена колленхимой (рис. 10).

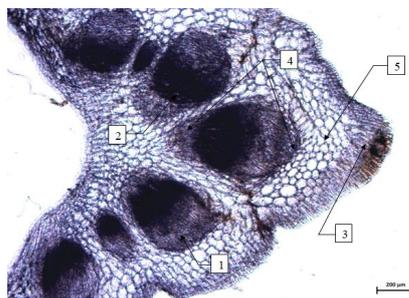


Рисунок 10 – Фрагмент поперечного среза центральной жилки листа (ув. x10): 1 – ксилема, 2 – флоэма, 3 – колленхима, 4 – склеренхима, 5 – паренхима.

На препарате поперечного среза черешка также присутствуют коллатеральные пучки, количество которых составляет от 10 до 14. С двух сторон от центрального пучка, симметрично расположены по одному пучку, втрое меньшего размера. Пучки срединной части черешка имеют размер аналогичный центральному (рис. 11).

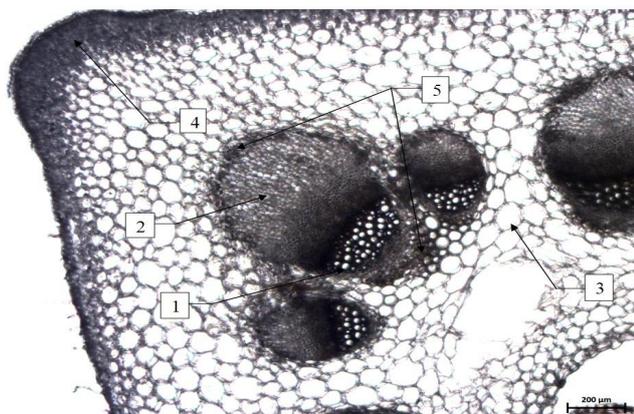


Рисунок 11 – Фрагмент поперечного среза черешка листа (ув. x10): 1 – ксилема, 2 – флоэма, 3 – паренхима, 4 – колленхима, 5 – склеренхима.

Основные числовые показатели, измельченность, влажность, общую золу, содержание примесей в сырье, определяли в соответствии с ОФС 1.5.1.0001.15 - Лекарственное растительное сырье и ОФС 1.5.3.0004.15 - Определение подлинности, измельченности и содержания примесей в лекарственном растительном сырье и лекарственных растительных препаратах [4].

Разработку показателей качества выполняли на 7 образцах сыра (табл. 1), собранных в Иркутской области, Республике Хакасия и Красноярском крае в различное время. Так как большинство частиц измельченного сыра имеют размер 6 и 4 (табл. 1), предлагаемая норма по измельченности сыра: частиц, не проходящих сквозь сито с размером отверстий 6 мм не более 2%.

Определение количества побуревших и почерневших листьев, частей других растений и минеральной примеси проводили в 3 повторных испытаниях (табл. 2). Среднее содержание побуревших и почерневших листьев, частей других растений и минеральной примеси в сыре составило  $2,75 \pm 0,96$ ;  $0,81 \pm 0,40$  и  $0,24 \pm 0,14$  % соответственно.

Таблица 1 – Результаты ситового анализа измельченности сыра *S. controversa*,  $n = 3$ .

Место и год сбора	Количество частиц, не проходящих, сквозь отверстия диаметром: 7 мм (1), 6 мм (2), 5 мм (3), 4 мм (4), 3 мм (5), 1 мм (6), 0,5 мм (7), 0,25 мм (8), проходящих сквозь отверстия диаметром 0,25 мм (9), %								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Красноярский край, окр. оз. Инголь; 2016	-	44,04± 0,32	1,39± 0,24	34,35 ±0,27	5,82± 0,30	10,53± 0,22	1,11± 0,15	1,66± 0,25	1,11± 0,20
Хакасия, окр. с. Мендоль; 2016	2,97± 0,12	30,08± 0,23	16,10± 0,19	27,12± 0,25	5,93± 0,37	10,59± 0,26	1,27± 0,14	3,39 ±0,22	1,27± 0,29
Хакасия, окр. с. Ефремино; 2016	0,5± 0,09	-	6,21± 0,15	28,73 ±0,32	7,73± 0,11	34,25± 0,30	4,42± 0,13	11,05 ±0,28	5,05± 0,22
Иркутская обл., окр. с. Кочергат; 2014	0,68± 0,07	39,13± 0,35	2,52± 0,12	17,16± 0,25	10,07± 0,18	11,21± 0,21	5,72± 0,17	7,55± 0,22	5,95± 0,28
Хакасия, окр. с. Мендоль; 2017	1,91± 0,13	36,38± 0,24	7,09± 0,15	23,72± 0,26	7,42± 0,18	16,21± 0,23	3,10± 0,11	5,30± 0,15	2,79± 0,08

Хакасия, окр. с. Ефрем- кино; 2017	2,03± 0,10	35,77± 0,39	15,45± 0,18	20,33± 0,20	6,50± 0,17	11,79± 0,25	2,44± 0,13	3,66± 0,15	2,03± 0,22
Хакасия, окр. с. Карлы- бас; 2017	3,33± 0,18	32,90± 0,27	4,89± 0,21	14,66± 0,26	8,47± 0,11	19,54± 0,23	3,58± 0,19	4,56± 0,13	0,98± 0,09
X±x	1,91± 1,14	36,38± 4,87	7,66± 5,88	23,72± 6,91	7,42± 1,52	16,22± 8,67	3,10± 1,66	5,31± 3,11	2,74± 2,00

Таблица 2 – Содержание примесей в сырье *S. controversa*, n = 3.

Место и год сбора	Примеси: побуревших частей растения (1), частей других растений (2), минеральная (3), %		
	1	2	3
Красноярский край, окр. оз. Инголь; 2016	3,00 ± 0,07	0,80 ± 0,05	0,50 ± 0,04
Хакасия, окр. с. Мендоль; 2016	2,00 ± 0,09	0,60 ± 0,06	0,30 ± 0,03
Хакасия, окр. с. Ефремкино; 2016	3,00 ± 0,05	0,50 ± 0,09	0,20 ± 0,02
Иркутская обл., окр. с. Кочергат; 2014	1,00 ± 0,10	0,50 ± 0,07	0,00
Хакасия, окр. с. Мендоль; 2017	3,89 ± 0,12	1,53 ± 0,14	0,25 ± 0,02
Хакасия, окр. с. Ефремкино; 2017	3,00 ± 0,04	0,50 ± 0,02	0,20 ± 0,03
Хакасия, окр. с. Карлыбас; 2017	3,40 ± 0,22	1,23 ± 0,18	0,24 ± 0,05
X±x	2,75± 0,96	0,81± 0,40	0,24± 0,14

Потеря в массе при высушивании составила  $7,20 \pm 0,84\%$ , общая зола и зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте –  $12,17 \pm 1,31$  и  $0,09 \pm 0,03$  % соответственно (таблица 3).

Таблица 3 – Результаты определения влажности и зольности сырья *S. controversa*, n = 3.

Место и год сбора	Потеря в массе при высушивании, %	Зола общая, %	Зола, не растворимая в конц. HCl, %
Красно-ярский край, окр. оз. Инголь; 2016	7,27 ± 0,36	12,83 ± 0,64	0,100 ± 0,005
Хакасия, окр. с. Мендоль; 2016	8,81 ± 0,44	13,38 ± 0,67	0,060 ± 0,003
Хакасия, окр.	6,86 ± 0,34	13,56 ± 0,69	0,090 ± 0,005

с. Ефремкино; 2016			
Иркутская обл., окр. с. Кочергат; 2014	6,26 ± 0,31	12,05 ± 0,60	0,050 ± 0,003
Хакасия, окр. с. Мендоль; 2017	7,40 ± 0,37	12,30 ± 0,74	0,140 ± 0,007
Хакасия, окр. с. Ефремкино; 2017	7,38 ± 0,37	11,27 ± 0,56	0,110 ± 0,006
Хакасия, окр. с. Карлыбас; 2017	6,42 ± 0,32	9,79 ± 0,49	0,100 ± 0,005
X±x	7,20 ± 0,84	12,17 ± 1,31	0,09 ± 0,03

Маркерами биологической активности 40% экстракта *S. controversa in vivo* являются полисахариды, флавоноиды и хелидоновая кислота [13-15]. Для разработки методик количественного определения и подлинности целевых БАВ были изучены различные условия экстракции: соотношение сырье-экстрагент, кратность, время, температура экстракции, размер частиц сырья. Оптимальные условия получения аналита оценивали по содержанию экстрактивных веществ (ЭВ), флавоноидов (УФ-спектроскопия), хелидоновой кислоты (ВЭЖХ) и полисахаридов (гравиметрия). Оптимальными условиями получения аналита являются: трехкратная экстракция листьев *S. controversa*, измельченных до 3-6 мм в соотношении 1:15 при 80°C в течение 60 мин (таблица 4).

Таблица 4– Влияние параметров экстракции на содержание целевых веществ в экстракте сосюреи спорной, n=3.

№	Соотношение	Кратность	Время, мин	T, °C	Размер частиц, мм	ЭВ, %	ФЛ, %	ХК, %	ПС, %
1	1:15 1:10 1:10	3	30	80	3-6	39,40± 0,20	0,80± 0,40	4,10± 0,05	3,52± 0,23
2	1:15 1:10 1:10	3	60	80	3-6	45,10± 0,30	0,93± 0,27	4,81± 0,20	3,66± 0,27
3	1:15 1:10 1:10	3	90	80	3-6	43,40± 0,30	0,98± 0,33	4,75± 0,04	3,56± 0,13
4	1:15 1:10	2	60	80	3-6	39,20± 0,22	0,85± 0,35	4,82± 0,05	3,70± 0,17
5	<b>1:15 1:15</b>	<b>3</b>	<b>60</b>	<b>80</b>	<b>3-6</b>	<b>45,70± 0,31</b>	<b>1,25± 0,20</b>	<b>5,02± 0,09</b>	<b>4,24± 0,12</b>

	<b>1:15</b>								
6	1:20 1:15 1:15	3	60	80	3-6	43,95± 0,29	1,05± 0,20	4,14± 0,11	3,83± 0,18
7	1:10 1:8 1:8	3	60	80	3-6	34,40± 0,15	1,04± 0,15	4,66± 0,03	3,95± 0,13
8	1:15 1:10 1:10	3	60	90	3-6	43,60± 0,25	1,10± 0,25	4,53± 0,03	3,90± 0,21
9	1:15 1:10 1:10	3	60	70	3-6	41,42± 0,25	1,09± 0,36	3,95± 0,05	3,92± 0,17
10	1:15 1:10 1:10	3	60	60	3-6	38,86± 0,18	1,12± 0,09	4,84± 0,15	3,75± 0,12
11	1:15 1:10 1:10	3	60	80	1	46,30± 0,25	1,15± 0,12	4,94± 0,02	3,84± 0,18
12	1:15 1:10 1:10	3	60	80	2-3	38,80± 0,15	1,15± 0,18	4,06± 0,06	3,94± 0,29
13	1:15 1:10 1:10 1:10	4	60	80	3-6	40,06± 0,15	1,01± 0,30	4,92± 0,23	4,05± 0,17

Примечание: ЭВ – экстрактивные вещества; ФЛ – флавоноиды; ХК – хелидоновая кислота; ПС – полисахариды

**Пробоподготовка анализа (для подлинности и количественного определения).** Аналитическую пробу сырья массой 1,0 г (т.н.), измельченного до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 3-6 мм помещают в колбу со шлифом вместимостью 100 мл, экстрагируют 15 мл 40% этанолом трижды по 60 мин на водяной бане при температуре 80 °С. Извлечения объединяют и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл, доводят 40% этанолом до метки и перемешивают (раствор А)

1. Подлинность растительного сырья по наличию хелидоновой кислоты устанавливается при ее количественном определении методом ВЭЖХ. На хроматограмме испытуемого раствора (раствор А) должен наблюдаться пик с временем удерживания хелидоновой кислоты (рис. 12).

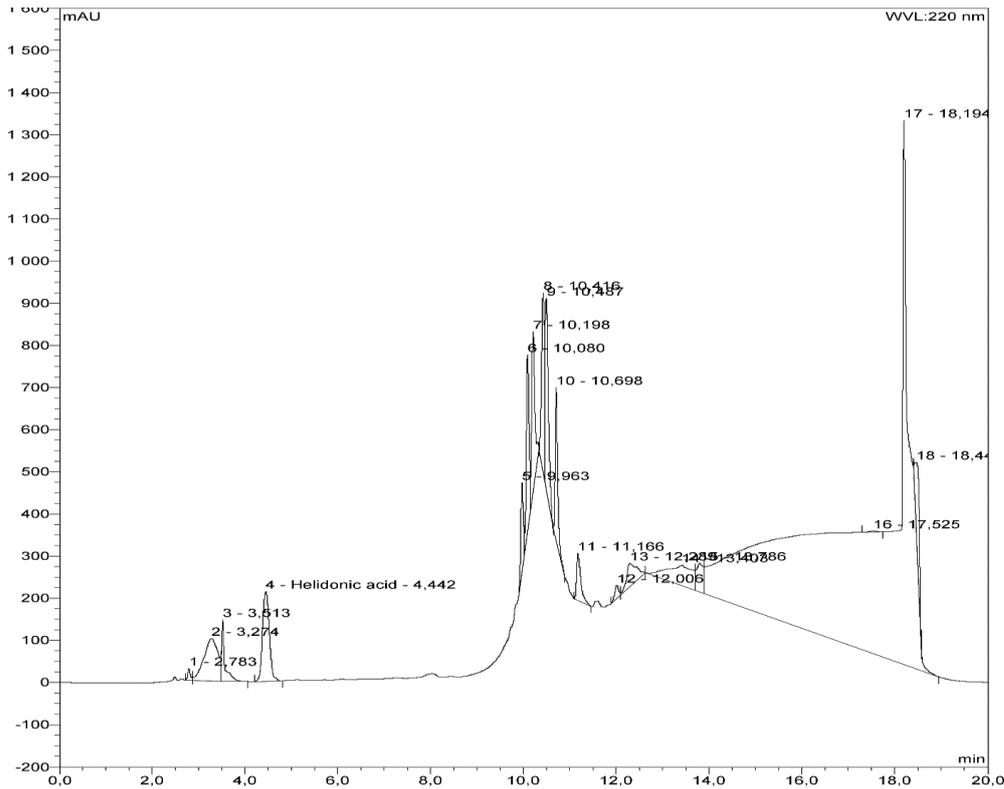


Рисунок 12 – Репрезентативная хроматограмма аналита

2. К 5 мл раствора А прибавляли 5 мл 5% этанольного раствора хлорида алюминия, 0,3 мл концентрированной хлороводородной кислоты – наблюдали образование комплекса желтого цвета (флавоноиды).

3. 25 мл раствора А упаривали до 5 мл, прибавляли 20 мл 96% этанола, наблюдали выпадение хлопьевидного осадка (полисахариды).

### **Методика количественного определения хелидоновой кислоты и ее валидация.**

Приготовление стандартного раствора хелидоновой кислоты: 0,0125 г (точная навеска) хелидоновой кислоты, высушенной до постоянной массы, помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл и растворяют в стартовой подвижной фазе, состоящей из 0,1 %-ого раствора трифторуксусной кислоты в воде и 0,1 %-ого раствора трифторуксусной кислоты в ацетонитриле (95:5), полученный раствор доводят до метки тем же растворителем. Аликвоту 1,0 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью 10 мл и доводят объем колбы до метки тем же растворителем.

Аликвоты по 20 мкл раствора А и стандартного раствора хелидоновой кислоты хроматографируют в следующих условиях: колонка 25 × 4,6 см, Luna C18(2), 5 мкм, Phenomenex; подвижная фаза – элюент А: 0,05 % ТФУ в воде; элюент Б – 0,05 % ТФУ в ацетонитриле; режим элюирования – градиентный: 0-5 мин. – 5-10 % Б; 5-10 мин. – 10-100 % Б; 10-15 мин. – 100% Б; 15-20 мин. – 5 % Б; скорость потока: 1,0 мл/мин; температура колонки: 40 °С; детектор: УФ-спектрофотометрический или диодно-матричный, 220 нм; время регистрации хроматограмм: 20 мин.

Расчет содержания хелидоновой кислоты в пересчете на абсолютно сухое растительное сырье проводят по формуле:

$$X(\%) = \frac{S \times m_o \times 4000}{a \times S_o \times (100 - w)}$$

где,  $S$  – площадь пика хелидоновой кислоты на хроматограмма раствора А,  $\text{mAU} \times \text{min}$ ;

$S_o$  – площадь пика на хроматограмме стандартного раствора,  $\text{mAU} \times \text{min}$ ;

$m_o$  – масса навески РСО хелидоновой кислоты, г;

$a$  – масса навески растительного сырья, г.

$w$  – потеря в массе при высушивании, %

Среднее содержание хелидоновой кислоты составило  $4,67 \pm 0,19\%$

По результатам валидации (табл. 5-7), методика количественного определения хелидоновой кислоты в листьях *S. controversa* является валидной и может быть использована в проекте фармакопейной статьи на лекарственное растительное сырье.

Таблица 5 – Оценка повторяемости методики определения содержания хелидоновой кислоты в листьях *S. controversa*.

Уровень содержания, %	Масса навески, г	$S$ , $\text{mAU} \times \text{min}$	$C_i(\text{ХК})$ , мг/мл	$\bar{C}$ , мг/мл	RSD, %	$\Delta$ , мг/мл
80	0,8145	26,9111	0,0409	0,040	4,06	0,002
	0,8073	24,8956	0,0379			
	0,8199	26,5066	0,0403			

	0,8014	27,1032	0,0412			
	0,8257	25,1419	0,0382			
	0,8009	27,4641	0,0418			
100	1,0503	36,1506	0,0550	0,051	3,89	0,002
	1,0537	33,2177	0,0505			
	1,0235	33,4232	0,0508			
	1,0216	33,3727	0,0508			
	1,0519	32,3145	0,0491			
	1,0422	33,2099	0,0505			
120	1,2410	41,3666	0,0629	0,063	3,00	0,002
	1,2211	42,0213	0,0639			
	1,2047	39,8546	0,0606			
	1,2720	42,3468	0,0644			
	1,2849	43,0975	0,0655			
	1,21731	40,2904	0,0613			

Таблица 6 – Оценка воспроизводимости методики определения содержания хелидоновой кислоты в листьях *S. controversa*.

Уровень содержания, %	$C_i(\text{XK}), \text{мг/мл}$	$\bar{C}, \text{мг/мл}$	$S_{x,i}$	F	$S_{x,j}$	$\bar{C}, \text{мг/мл}$	RSD, %
80	0,0409	0,0401	0,00066	1,06	0,00155	0,0340	3,91
	0,0379						
	0,0403						
	0,0412						
	0,0382						
	0,0418						
	0,0398	0,0394	0,00063				
	0,0388						
	0,0404						
	0,0376						
	0,0416						
	0,0379						
100	0,0550	0,0511	0,00081	1,18	0,00182	0,0516	3,54
	0,0505						
	0,0508						
	0,0508						
	0,0491						

Уровень содержания, %	$C_i(\text{ХК}), \text{ мг/мл}$	$\bar{C}, \text{ мг/мл}$	$S_{x,i}$	F	$S_{x,j}$	$\bar{C}, \text{ мг/мл}$	RSD, %
	0,0505	0,0521	0,00069				
	0,0505						
	0,0531						
	0,0535						
	0,0495						
	0,0523						
	0,0535						
120	0,0629	0,0631	0,00077	1,05	0,00176	0,0632	2,79
	0,0639						
	0,0606						
	0,0644						
	0,0655						
	0,0613						
	0,0614	0,0632	0,00074				
	0,0624						
	0,0612						
	0,0656						
	0,0649						
	0,0636						

Таблица 7 – Оценка правильности методики определения хелидоновой кислоты в листьях *S. controversa* DC. методом «введено-найдено»

Уровень содержания, %	Введено ХК, мг/мл	Найдено, мг/мл	$\delta$
80	0,025	0,0651	99,83
100		0,0759	100,91
120		0,0885	98,47

### Методика количественного определения флавоноидов и ее валидация.

5 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 5 мл 5% этанольного раствора хлорида алюминия, 0,3 мл концентрированной хлороводородной кислоты и доводили 95% этанолом до метки. Оптическую плотность испытуемого раствора измеряли на спектрофотометре при длине волны 410 нм через 60 мин. Параллельно измеряли оптическую плотность раствора стандартного образца рутина. Для этого 1 мл 0,02% раствора рутина-стандарта помещали в мерную колбу

емкостью 25 мл, прибавляли 5 мл 5% этанольного раствора хлорида алюминия, 0,3 мл концентрированной хлороводородной кислоты и доводили до метки 95% этанолом.

Приготовление раствора ГСО рутина: 0,0050 г (точная навеска) ГСО рутина, высушенного до постоянной массы при температуре 100-105°C, растворяли в мерной колбе емкостью 25 мл в небольшом количестве подогретого 95% этанола и доводили объем до метки тем же растворителем.

Расчет содержания суммы флавоноидов (%) осуществляли по формуле:

$$X\% = \frac{A \cdot M_0 \cdot 100 \cdot 25 \cdot 1 \cdot 100 \cdot 100}{A_0 \cdot M \cdot 5 \cdot 25 \cdot 25 \cdot (100 - w)} = \frac{A \cdot M_0 \cdot 8000}{A_0 \cdot M \cdot (100 - w)}$$

Где, А—оптическая плотность испытуемого раствора.

$A_0$ —оптическая плотность ГСО рутина (среднее из трех измерений).

$M_0$ —масса ГСО рутина, г.

$M$ —масса навески сырья, г.

$W$ —потеря в массе при высушивании, %.

Среднее содержание флавоноидов в пересчете на рутин составило 1,51 ± 0,67 %

Валидационные характеристики методики количественного определения флавоноидов в листьях *S. controversa*, приведены в таблицах 8-10. По результатам валидации, методика количественного определения флавоноидов в листьях *S. controversa*, является валидной и может быть использована в проекте фармакопейной статьи на лекарственное растительное сырье.

Таблица 8 – Оценка повторяемости методики определения содержания флавоноидов в листьях *S. controversa*.

Уровень содержания, %	Масса навески, г	Оптическая плотность, mAU	$C_i$ (ФЛ), мг/мл	$\bar{C}$ , мг/мл	RSD, %	$\Delta$ , мг/мл
80	0,8145	0,3193	0,0169	0,0163	2,82	0,0005
	0,8073	0,2947	0,0157			
	0,8199	0,3096	0,0162			

	0,8014	0,2955	0,0159			
	0,8257	0,3145	0,0164			
	0,8009	0,3113	0,0167			
100	1,0503	0,4786	0,0196	0,0202	2,80	0,0006
	1,0537	0,5047	0,0206			
	1,0235	0,4759	0,0200			
	1,0216	0,4655	0,0196			
	1,0519	0,4989	0,0204			
	1,0422	0,5089	0,0210			
120	1,2410	0,6982	0,0242	0,0251	2,79	0,0007
	1,2211	0,7438	0,0262			
	1,2047	0,7058	0,0252			
	1,2720	0,7275	0,0246			
	1,2849	0,7409	0,0248			
	1,21731	0,7189	0,0254			

Таблица 9 – Оценка воспроизводимости методики определения содержания флавоноидов в листьях *S. controversa*.

Уровень содержания, %	$C_i$ (ФЛ), мг/мл	$\bar{C}$ , мг/мл	$S_{x,i}$	F	$S_{x,j}$	$\bar{C}$ , мг/мл	RSD, %
80	0,0169	0,0163	0,00019	1,39	0,0004	0,0165	2,55
	0,0157						
	0,0162						
	0,0159						
	0,0164						
	0,0167						
	0,0167	0,0166	0,00014				
	0,0162						
	0,0170						
	0,0163						
	0,0169						
0,0167							
100	0,0196	0,0202	0,00023	1,11	0,0006	0,0205	3,07
	0,0206						
	0,0200						
	0,0196						
	0,0204						
	0,0210						
	0,0204	0,0207	0,00026				
	0,0206						
	0,0198						

Уровень содержания, %	$C_i(\text{ФЛ}), \text{ мг/мл}$	$\bar{C}, \text{ мг/мл}$	$S_{x,i}$	F	$S_{x,j}$	$\bar{C}, \text{ мг/мл}$	RSD, %
	0,0216						
	0,0206						
	0,0212						
120	0,0242	0,0251	0,00029	1,44	0,0009	0,0248	3,48
	0,0262						
	0,0252						
	0,0246						
	0,0248						
	0,0254						
	0,0256	0,0246	0,00041				
	0,0238						
	0,0248						
	0,0244						
	0,0258						
	0,0232						

Таблица 10 – Оценка правильности методики определения содержания флавоноидов в листьях *S. controversa*, методом «введено-найдено»

Уровень содержания, %	Введено, мг/мл	Найдено, мг/мл	$\delta$
80	0,025	0,0415	99,18
100	0,025	0,0453	99,60
120	0,025	0,0498	101,08

### Методика количественного определения полисахаридов и ее валидация.

25 мл (аликвота) раствора А упаривали до 5 мл, прибавляли 20 мл 96% этанола, отстаивали в течение 15 минут, осадок переносили на предварительно взвешенный бумажный фильтр в воронке Бюхнера, промывали 15 мл 96% этанола, затем фильтр сушили до постоянной массы и взвешивали. Расчет содержания полисахаридов проводили по следующей формуле:

$$X\% = \frac{(m_2 - m_1) \cdot 100 \cdot 100 \cdot 100}{m \cdot V_{\text{аликвоты}} \cdot (100 - w)}$$

Где  $m$  – масса навески сырья, г.

$m_1$  – масса фильтра, г.

$m_2$  – масса фильтра с осадком, г.

w– потеря в массе при высушивании, %.

Среднее содержание полисахаридов составило  $5,88 \pm 1,24$ .

По результатам валидации, методика количественного определения полисахаридов в листьях *S. controversa* является валидной и может быть использована в проекте фармакопейной статьи на лекарственное растительное сырье (табл.11-13).

Таблица 11 – Оценка повторяемости методики количественного определения полисахаридов в листьях *S. controversa*.

Уровень содержания, %	Масса навески сырья, г	$m_i(\text{ПС}), \text{г}$	$\bar{m}, \text{г}$	RSD, %	$\Delta, \text{г}$
80	0,8145	0,0139	0,0138	4,22	0,0006
	0,8073	0,0132			
	0,8199	0,0142			
	0,8014	0,0135			
	0,8257	0,0147			
	0,8009	0,0134			
100	1,0503	0,0186	0,0179	3,74	0,0007
	1,0537	0,0177			
	1,0235	0,0178			
	1,0216	0,0172			
	1,0519	0,0188			
	1,0422	0,0173			
120	1,2410	0,0212	0,0211	3,17	0,0007
	1,2211	0,0205			
	1,2047	0,0209			
	1,2720	0,0214			
	1,2849	0,0222			
	1,21731	0,0203			

Таблица 12 – Оценка воспроизводимости методики определения содержания полисахаридов в листьях *S. controversa*.

Уровень содержания, %	$m_i(\text{ПС}), \text{г}$	$\bar{m}, \text{г}$	$S_{x,i}$	F	$S_{x,j}$	$\bar{m}, \text{г}$	RSD, %
80	0,0134	0,0136	0,00021	1,20	0,00049	0,0138	3,55
	0,0133						
	0,0142						
	0,0129						
	0,0141						
	0,0134						
	0,0139	0,0139	0,00017				

	0,0135						
	0,0141						
	0,0137						
	0,0139						
	0,0147						
100	0,0186	0,0178	0,00023	1,02194	0,00061	0,0175	3,48
	0,0177						
	0,0178						
	0,0172						
	0,0183						
	0,0173						
	0,0165	0,0172	0,00023				
	0,0172						
	0,0168						
	0,0175						
0,0181							
0,0174							
120	0,0209	0,0208	0,00028	1,33	0,00061	0,0210	2,90
	0,0202						
	0,0203						
	0,0213						
	0,0220						
	0,0203						
	0,0210	0,0212	0,00021				
	0,0209						
	0,0214						
	0,0216						
	0,0218						
	0,0205						

Таблица 13 – Оценка правильности методики определения содержания полисахаридов в листьях *S. controversa*, методом «введено-найдено»

Уровень содержания, %	Введено, г	Найдено, г	$\delta$
80	0,025	0,0385	101,26
100		0,0422	102,85
120		0,0462	99,52

Результаты количественного определения БАВ в листьях *S. controversa* из различных мест сбора представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Содержание БАВ в листьях *S. controversa*, n=3

Место и год сбора	Содержание флавоноидов, %	Содержание хелидоновой кислоты, %	Содержание полисахаридов, %
Красноярский край, окр. оз. Инголь; 2016	1,26 ± 0,10	4,44 ± 0,10	8,12 ± 0,20
Хакасия, окр. с. Мендоль; 2016	1,50 ± 0,19	5,47 ± 0,01	5,00 ± 0,50
Хакасия, окр. с. Ефремкино; 2016	1,06 ± 0,27	4,87 ± 0,11	4,98 ± 0,54
Иркутская обл., окр. с. Кочергат; 2014	1,32 ± 0,20	5,05 ± 0,10	4,34 ± 0,14
Хакасия, окр. с. Мендоль; 2017	1,22 ± 0,32	4,66 ± 0,57	6,82 ± 0,14
Хакасия, окр. с. Ефремкино; 2017	1,24 ± 0,12	3,87 ± 0,11	5,88 ± 1,36
Хакасия, окр. с. Карлыбас; 2017	3,01 ± 0,11	4,29 ± 0,01	5,50 ± 0,58
X±x	1,51 ± 0,67	4,67 ± 0,52	5,88 ± 1,24

На основании полученных результатов определены нормы качества сырья для его стандартизации (табл. 15).

Таблица 15 – Нормы качества сырья, листьев сосюреи спорной.

№ п/п	Показатели	Содержание в сырье, %	Закладываемые нормы, %
1.	Части сырья, утратившие окраску (почерневшие, пожелтевшие)	2,75 ± 0,96	не более 4,0
2.	Части других не ядовитых растений	0,81 ± 0,40	не более 1,5
3.	Минеральная примесь	0,24 ± 0,14	не более 1,0
4.	Потеря в массе при высушивании	7,20 ± 0,84	не более 8,5
5.	Зола общая	12,17 ± 1,31	не более 14,0
6.	Зола нерастворимая в 10%-м растворе хлористоводородной кислоты	0,09 ± 0,03	не более 0,3
7.	Сумма флавоноидов	1,51 ± 0,67	не менее 0,8
8.	Хелидоновая кислота	4,67 ± 0,19	не менее 3,0
9.	Сумма полисахаридов	5,88 ± 1,24	не менее 4,0

Наблюдение показателей качества образцов сырья проводилось в течение 3 лет. На протяжении всего срока хранения показатели качества не изменялись или изменялись незначительно в пределах статистической погрешности. Поэтому, рекомендуемый срок годности сырья – 3 года.

### Список литературы

1. Авдеева, Е.Ю. Выбор оптимальной технологии экстракта сосюреи спорной, стимулирующего гемопоэтическую функцию костного мозга, обладающего остеогенной и иммуностропной активностью / Е.Ю. Авдеева, Я.Е. Решетов, Е.И. Гулина и др. // Традиционная медицина. – 2019. – №3(58). – С. 40-44.
2. Авдеева, Е.Ю. Сравнительная оценка остеогенной активности и влияния на гемопоэтическую функцию красного костного мозга фракций экстрактов *Saussurea controversa* и *Filipendula ulmaria* при экспериментальном остеомиелите / Е.Ю. Авдеева, М.Г., Скороходова, И.В. Суходоло и др. // Бюллетень сибирской медицины. – 2019. – Т.18. – № 3. – С. 6-15.
3. Авдеева, Е.Ю. Эффективность экстрактов *Saussurea controversa* и *Filipendula ulmaria* на фоне антибиотикотерапии остеомиелита в эксперименте / Е.Ю. Авдеева, М.Г., Скороходова, И.В. Суходоло и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2019. – Т.82. – №12. – С.41-46.
4. Государственная фармакопея Российской Федерации XIV издания. – М., 2018.
5. Лигачёва, А.А. Влияние способа получения на состав полисахаридов *Saussurea controversa* DC. и их NO-стимулирующую активность / А.А. Лигачёва, Я.Е. Решетов, Е.Ю. Авдеева и др. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – 2019. – 22(7). – С. 47-52.
6. Перевозчикова, Т.В. Влияние экстрактов *Saussurea controversa* и *Filipendula ulmaria* на иммунологическую реактивность крыс с экспериментальным остеомиелитом / Т.В. Перевозчикова, Е.Ю. Авдеева, Е.А. Файт и др. // Эксперим. и клинич. фармакология. – 2016. – Т. 79. – № 6. – С. 68-72.

7. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование; Семейство Asteraceae (Compositae). – СПб: «Наука». – 1993. – 352с.
8. Решетов, Я.Е. Полисахариды трех видов *Saussurea* DC (*S. controversa*, *S. salicifolia*, *S. frolovii*): выделение, характеристика и влияние на НО-продуцирующие свойства макрофагов / Я.Е. Решетов, А.А. Лигачёва, Авдеева Е.Ю. и др. // Химия растительного сырья. – 2019. – № 4. – С. 77-85.
9. Салохин, А.В. Стоматография листьев короткокорневищных видов *Cypripedium* (Orchidaceae) Восточной Сибири и Дальнего Востока / А.В.Салохин, С.А. Волкова, П.Г. Горовой // Turczaninowia. – 2005. – №8. – С.69–74.
10. Свиридова, Т.П. Биологические особенности *Saussurea controversa* DC. (Asteraceae) при интродукции на юге Томской области / Т.П. Свиридова // Вестник Томского государственного университета. – 2012. – № 356. – С. 176-178.
11. Федоров, Н.И. О методических подходах к контролю динамики важнейших ресурсных видов лекарственной флоры республики Башкортостан / Н.И. Федоров, С.Н. Жигунова, О.И. Михайленко // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2011. – Т. 5. – В. 3. – С. 113-115.
12. Эбель, А.Л. Определитель растений Томской области / А.Л. Эбель, А.И. Пяк, А.С. Ревушкин. – Томск: изд-во ТГУ, 2014. – 463 с.
13. Avdeeva, E. Flavonol glycosides from *Saussurea controversa* and their efficiency in experimental osteomyelitis / E. Avdeeva, E. Shults, M. Skorokhodova // Planta Medica International Open. – 2018. – № 5. – P. e24-e29.
14. Avdeeva, E. Chelidonic Acid and its Derivatives from *Saussurea Controversa*: Isolation, Structural elucidation and Influence on the Osteogenic Differentiation of Multipotent Mesenchymal Stromal Cells in Vitro / E. Avdeeva, E. Shults, T. Rybalova et al. // Biomolecules. – 2019. – 9(5). – P. 1-12.

15. Khlusov, I. Comparative In Vitro Evaluation of Antibacterial and Osteogenic Activity of Polysaccharide and Flavonoid Fractions Isolated from the leaves of *Saussurea controversa* / I. Khlusov, E. Avdeeva, V. Shupletsova et al. // *Molecules*. – 2019. – 24(20). – P. 1-15.
16. Shurupova, M.N. Population structure, resource potential and diagnostic features of raw materials of *Saussurea controversa* DC. / M.N. Shurupova, E.P. Parshina, Ya.E. Reshetov et al. // *Tomsk State University Journal of Biology*. – 2019. – № 45. – P. 34–46.

Минздрав России

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Сибирский государственный медицинский  
университет» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации  
(ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России)

Московский тракт, д. 2, г. Томск, 634050  
Телефон (3822) 53 04 23;  
Факс (3822) 53 33 09  
e-mail: office@ssmu.ru  
http://www.ssmu.ru  
ОКПО 01963539 ОГРН 1027000885251  
ИНН 7018013613 КПП 701701001

22.07.2020 № 2395  
На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств  
медицинского применения» Минздрава  
России

Петровский бульвар, д. 8, стр. 2  
Москва, 127051

Генеральному директору, доктору  
медицинских наук  
Олефиру Ю.В.

*О направлении проекта фармакопейной статьи*

Уважаемый Юрий Витальевич!

Направляем на согласование проект Фармакопейной статьи «Сосюреи спорной  
листья» для включения в ГФ XV издания.

Приложения: 1. Проект Фармакопейной статьи «Сосюреи спорной  
листья» – 1 экз;  
2. Пояснительная записка – 1 экз;  
3. Инструкция по сбору и сушке листьев сосюреи  
спорной – 1 экз.

Проректор по научной работе  
и последипломной подготовке

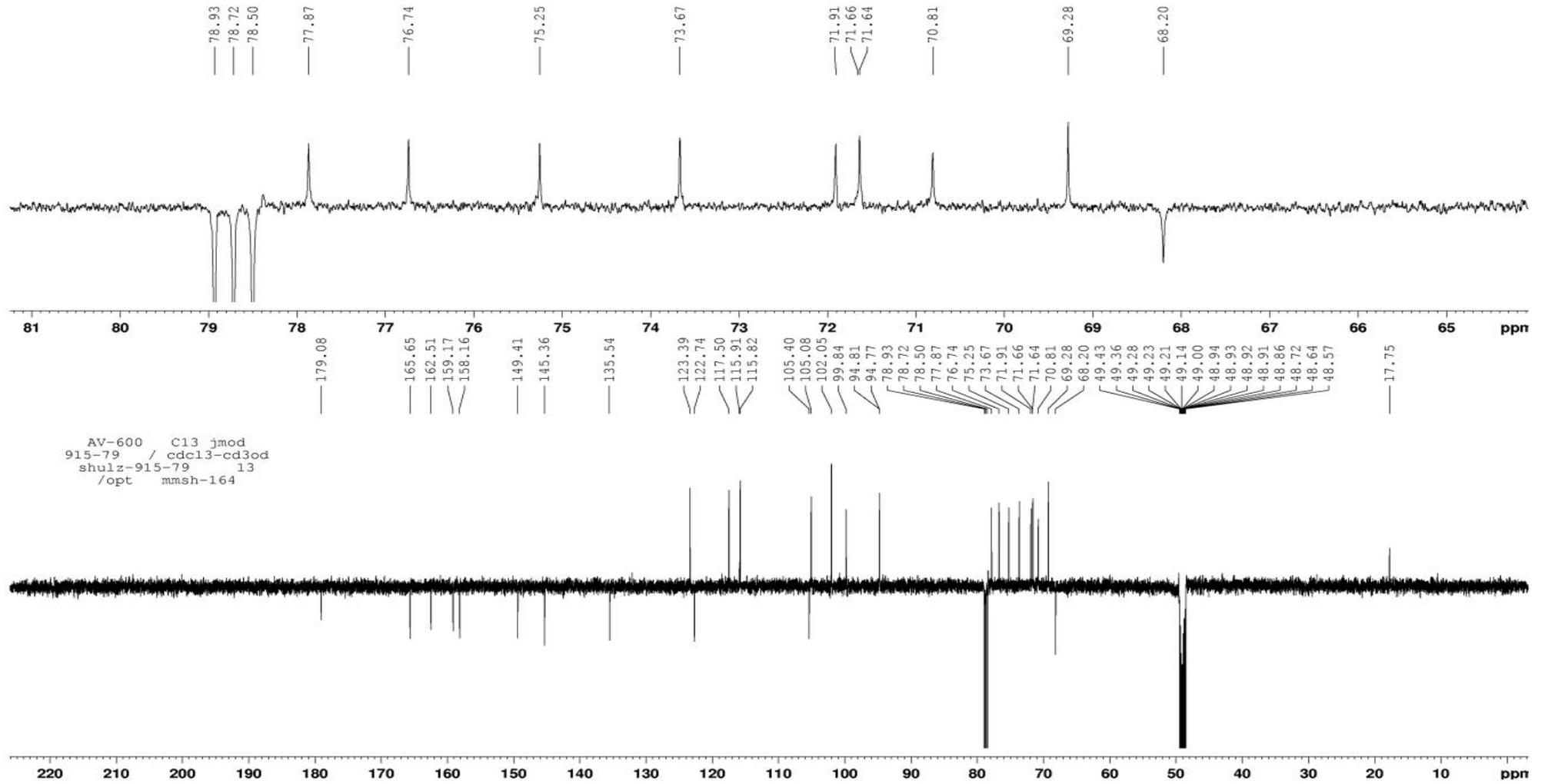
Е. Ю. Авлеева  
+79833447381

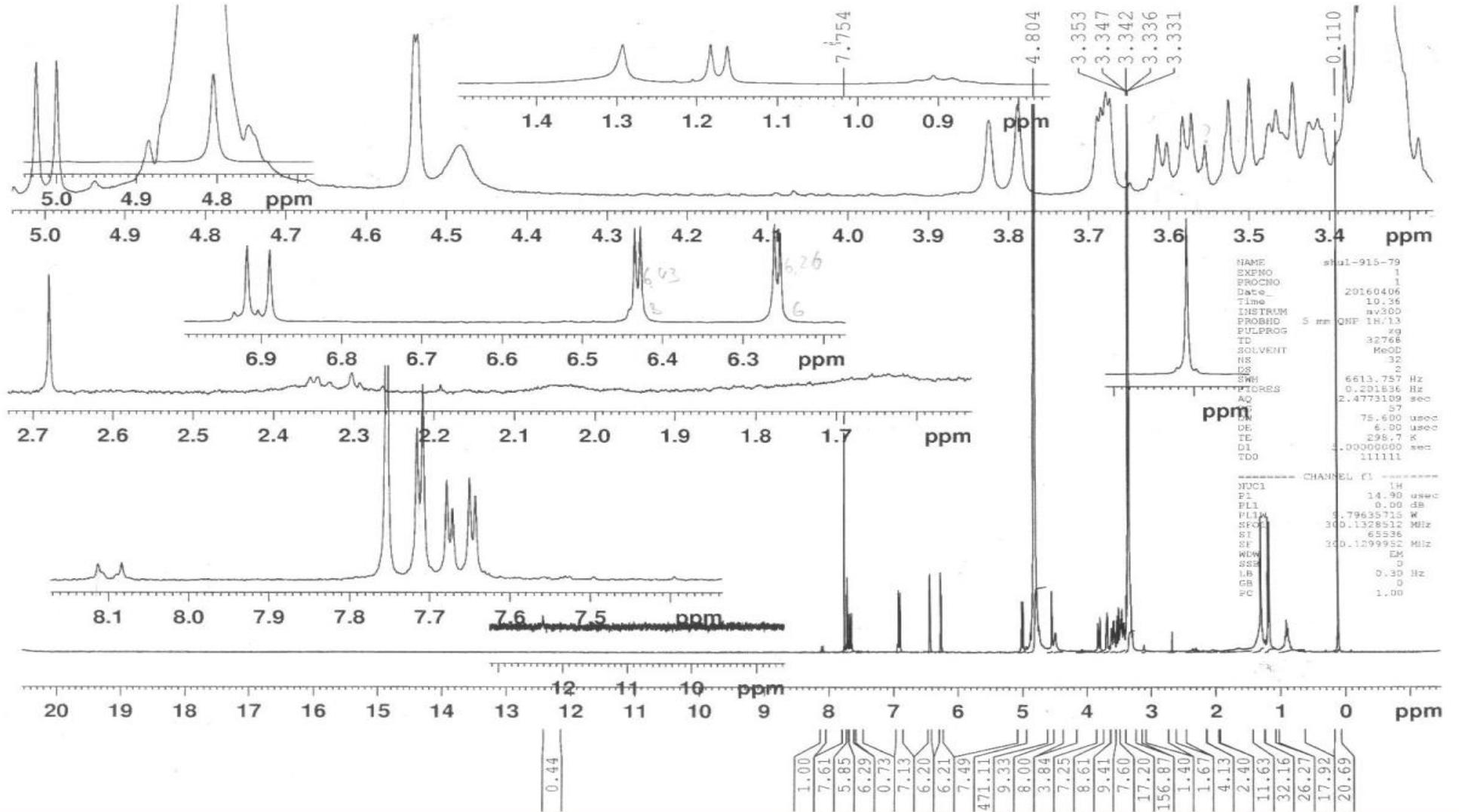
  
Е.С. Куликов

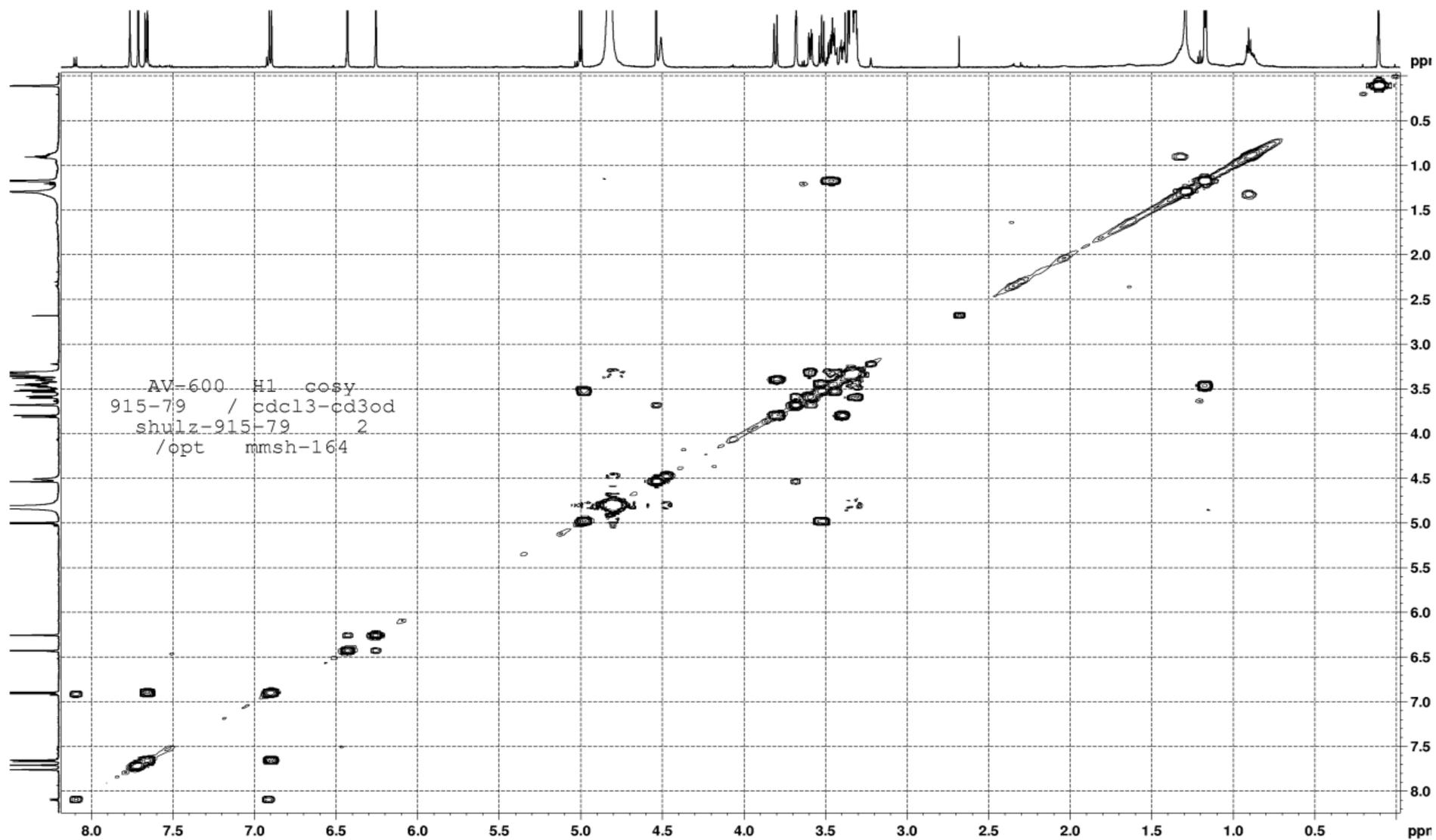


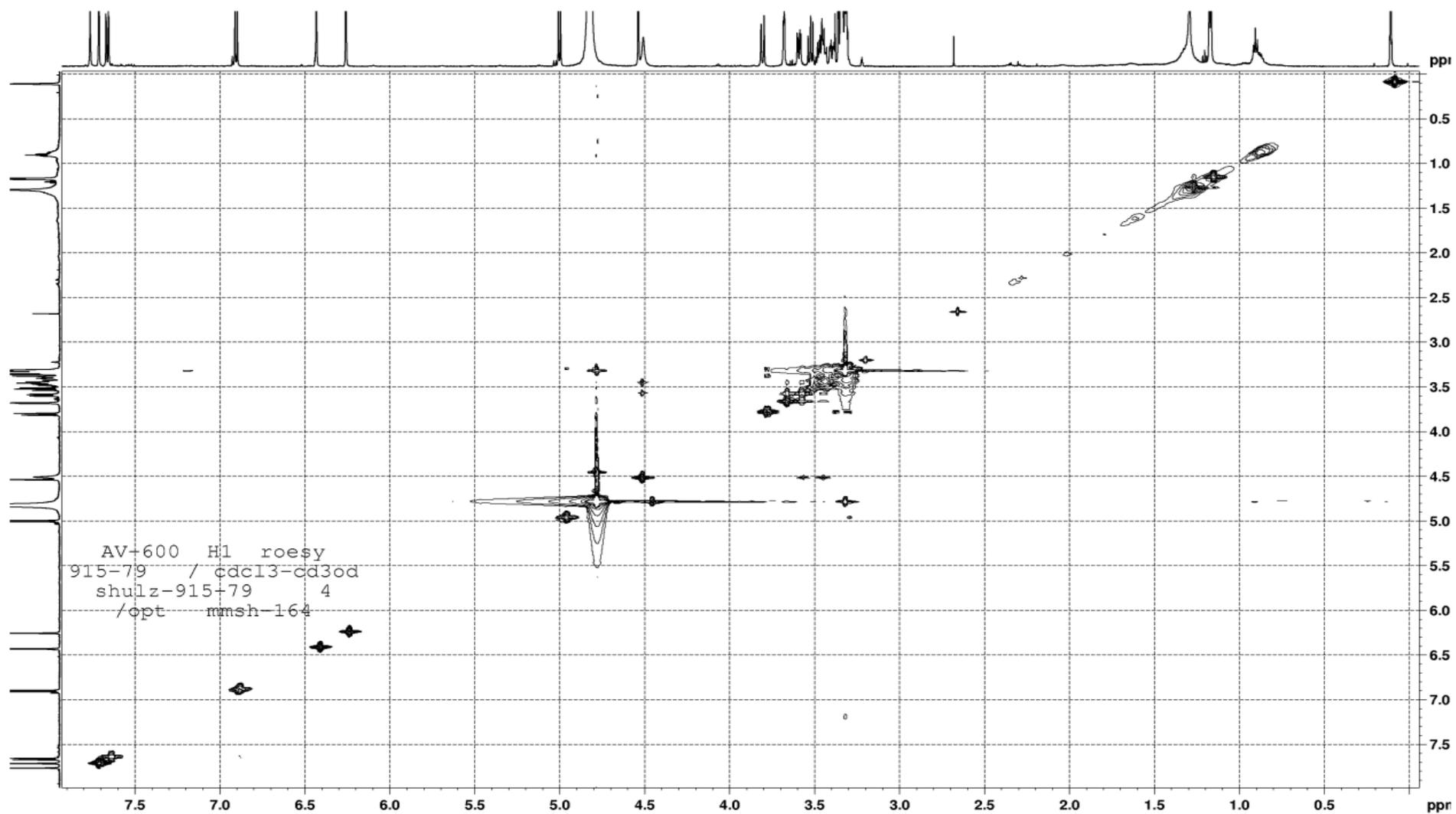
## **ПРИЛОЖЕНИЕ № 2**

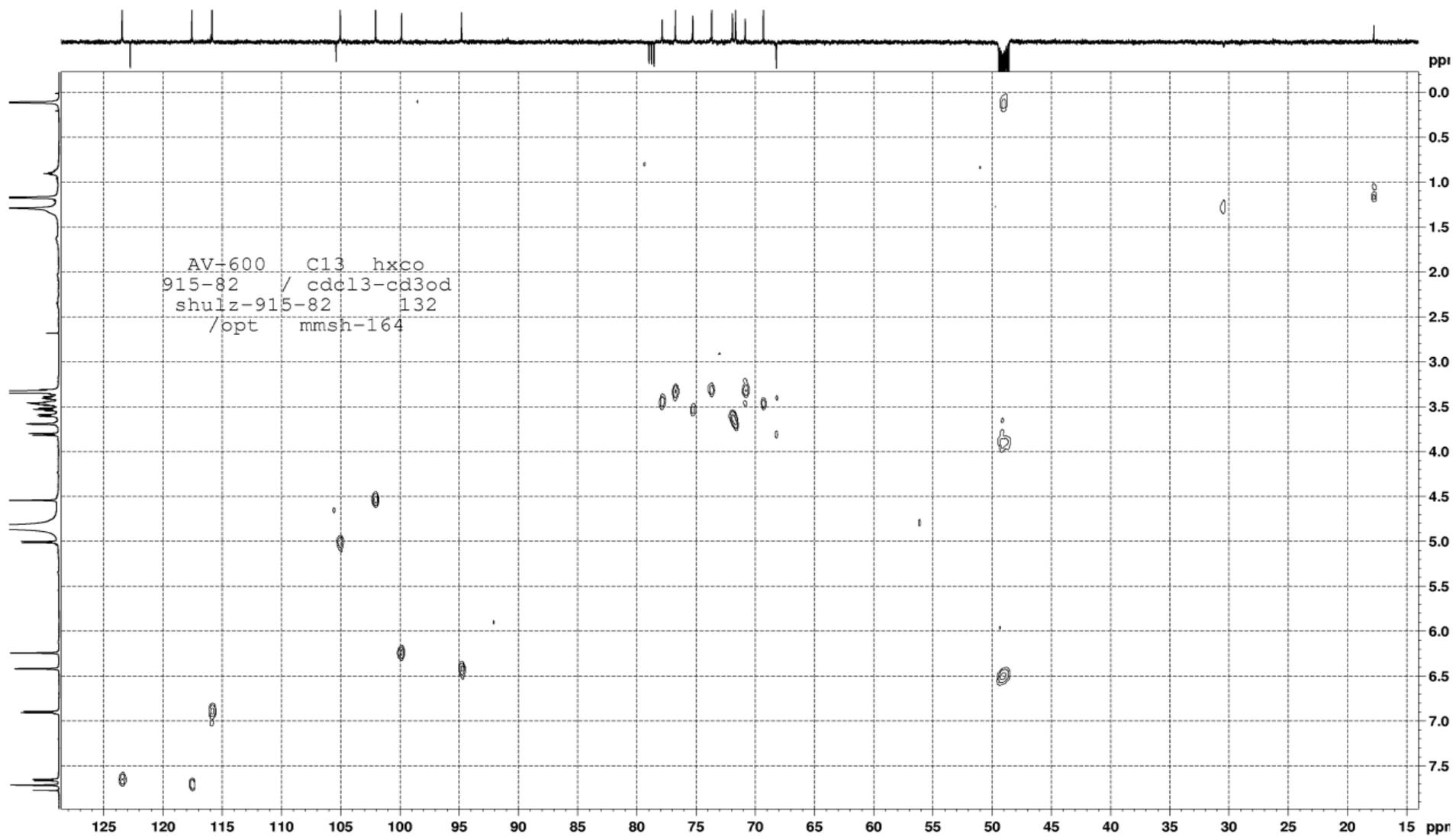
ЯМР спектры 7-О- $\alpha$ -L-рамнозид-3-О- $\beta$ -D-  
глюкозид кверцетина

ЯМР  $^{13}\text{C}$ -спектр 7-О- $\alpha$ -L-рамнозид-3-О- $\beta$ -D-глюкозид кверцетина

ЯМР  $^1\text{H}$ -спектр 7-О- $\alpha$ -L-рамнозид-3-О- $\beta$ -D-глюкозид кверцетина

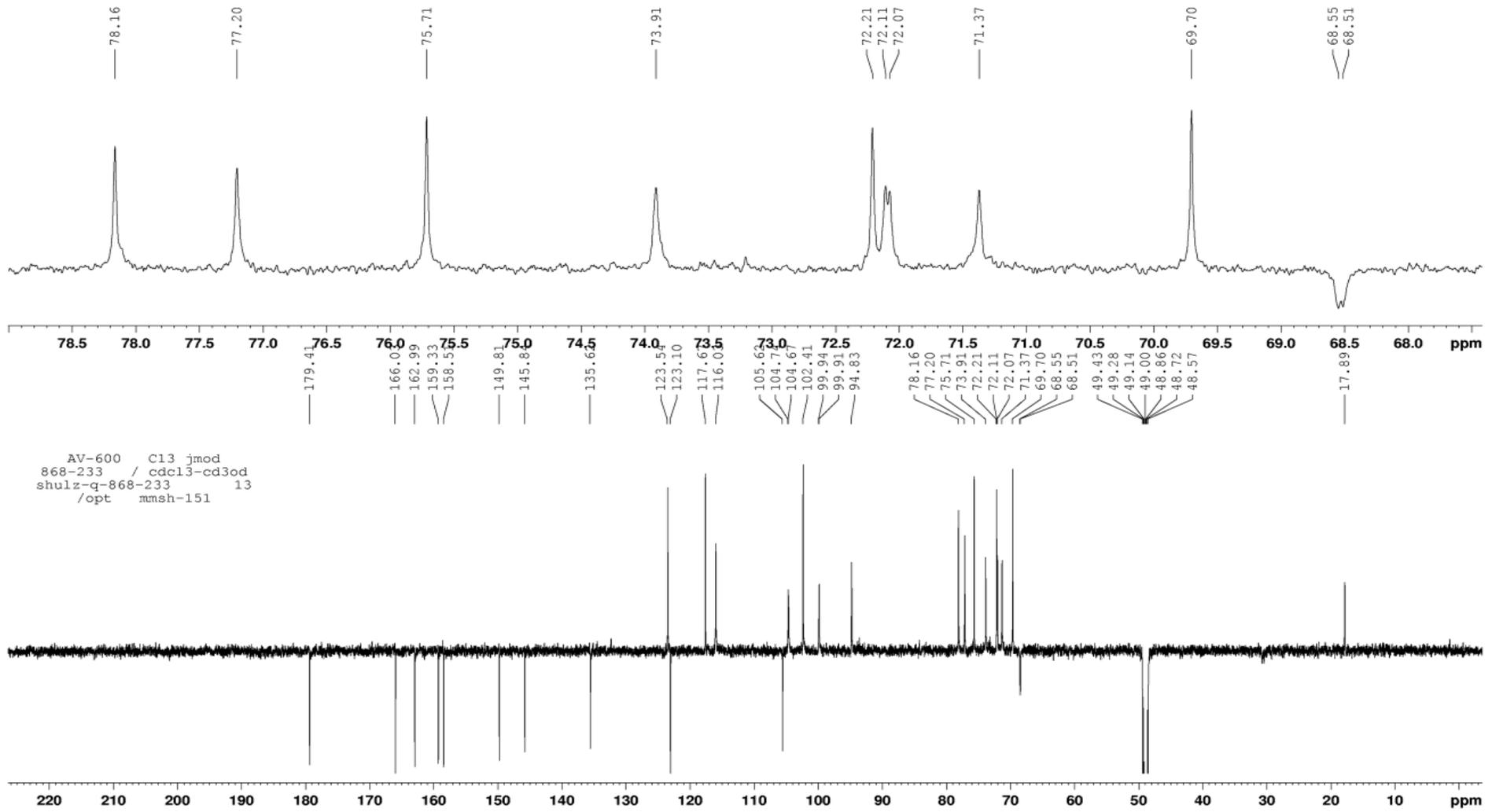
ЯМР  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  спектр COSY 7-O- $\alpha$ -L-рамнозид-3-O- $\beta$ -D-глюкозид кверцетина

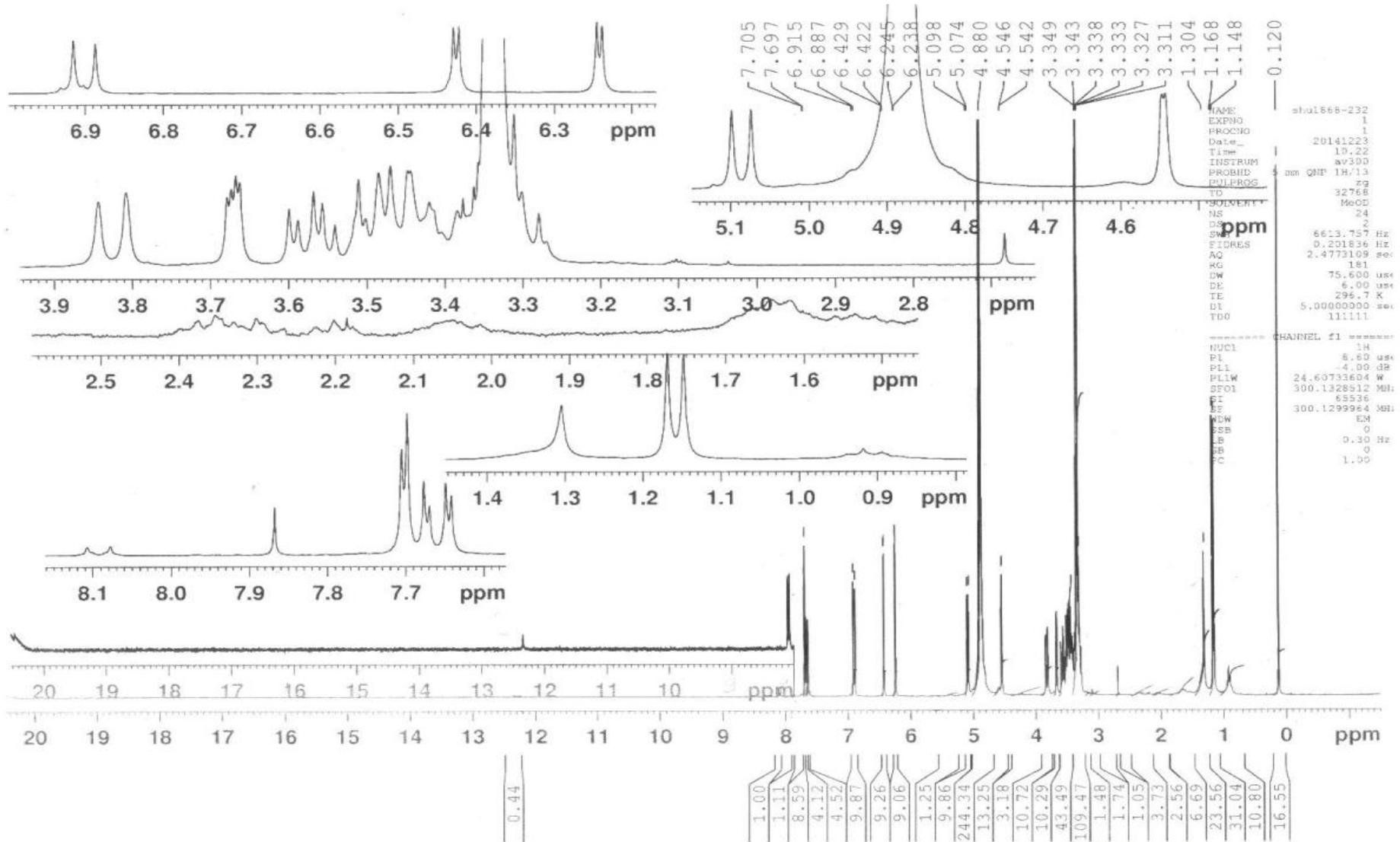
ЯМР  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  спектр ROESY 7-O- $\alpha$ -L-рамнозид-3-O- $\beta$ -D-глюкозид кверцетина

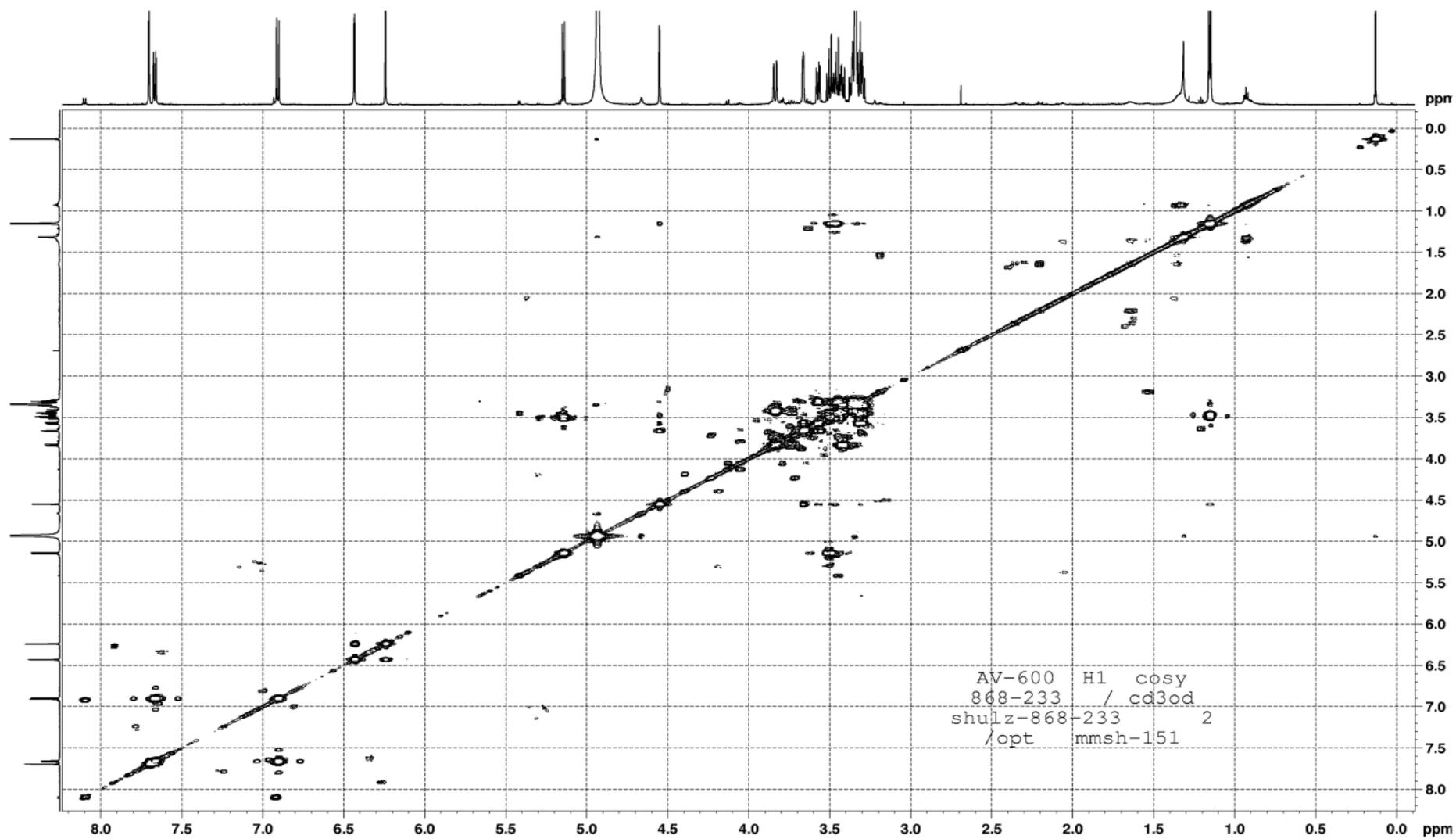
ЯМР  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  СОМХ 7-О- $\alpha$ -L-рамнозид-3-О- $\beta$ -D-глюкозид кверцетина

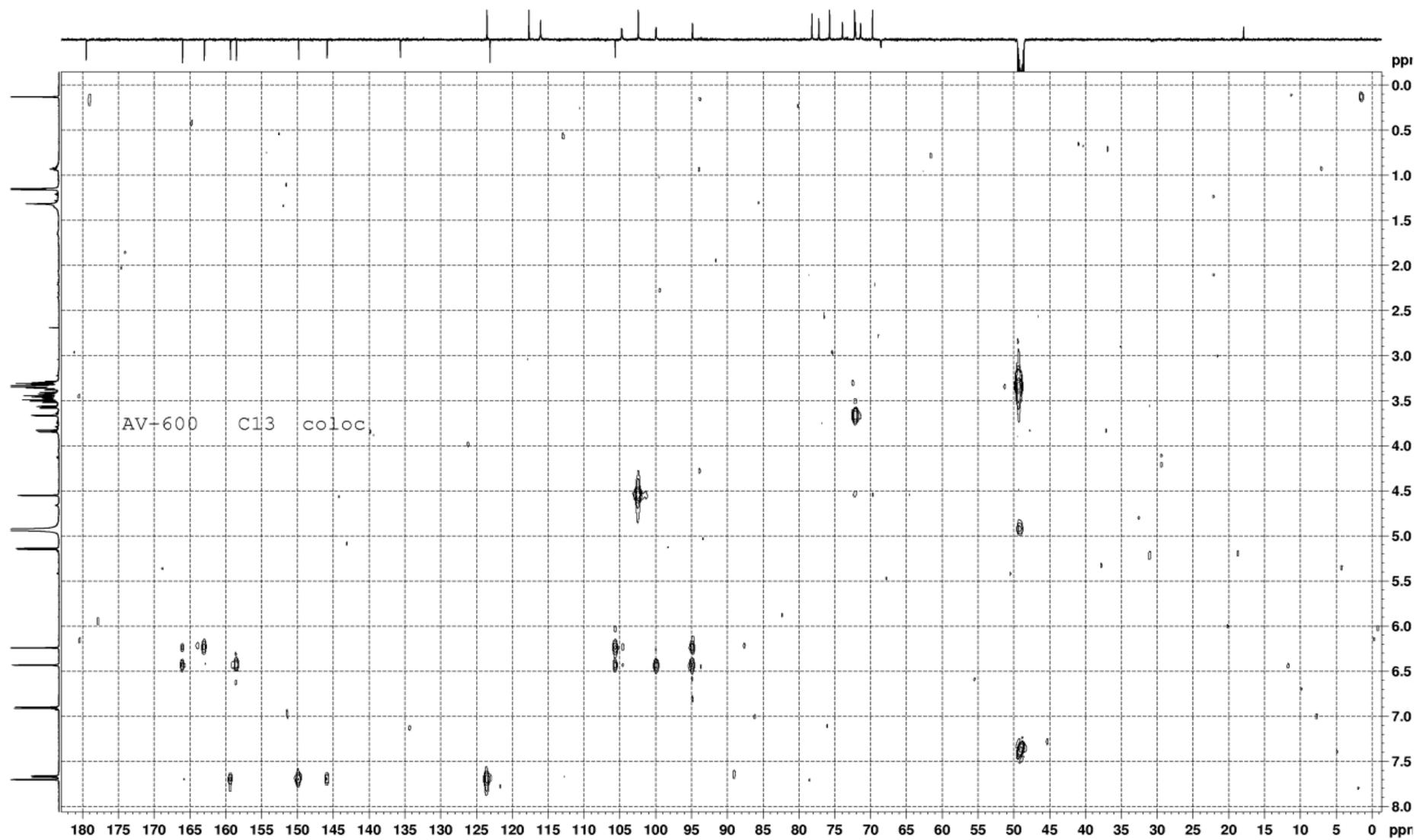
## **ПРИЛОЖЕНИЕ № 3**

ЯМР спектры 3-О-β-D-диглюкозид-  
О-α-L-рамнозид кверцетина

ЯМР  $^{13}\text{C}$ -спектр 3-О- $\beta$ -D-диглюкозид-О- $\alpha$ -L-рамнозид кверцетина

ЯМР  $^1\text{H}$ -спектр 3-O- $\beta$ -D-диглюкозид-O- $\alpha$ -L-рамнозид кверцетина

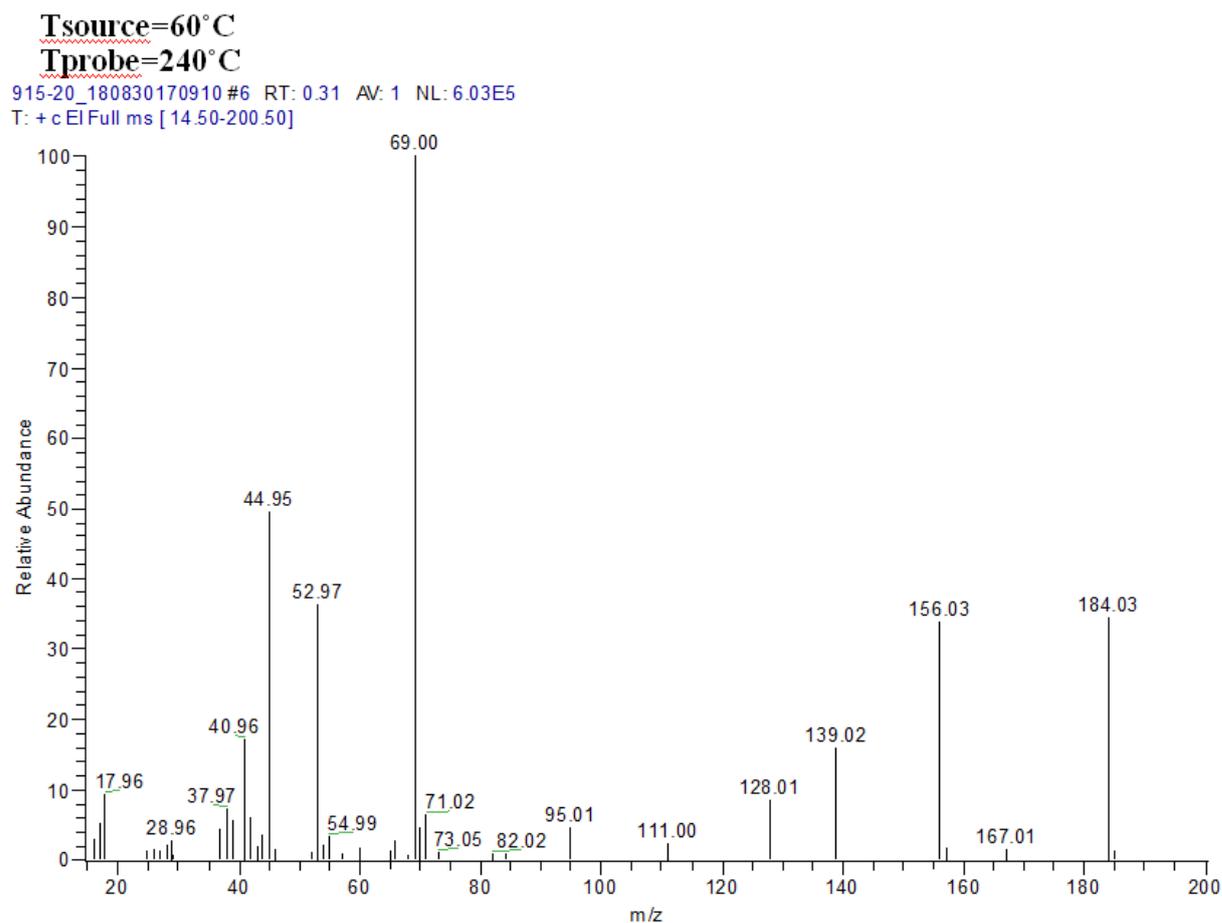
ЯМР  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  спектр COSY 3-O- $\beta$ -D-диглюкозид-O- $\alpha$ -L-рамнозид кверцетина

ЯМР  $^{13}\text{C}$  спектр COLOC 3-О- $\beta$ -D-диглюкозид-О- $\alpha$ -L-рамнозид кверцетина

## **ПРИЛОЖЕНИЕ № 4**

Масс- и ЯМР спектры 4-оксо-4Н-пирин-2,6-  
дикарбоновой кислоты

## Масс-спектр 4-оксо-4Н-пиран-2,6-дикарбоновой кислоты



Расчетное значение  $(C_7H_4O_6)^+$   $m/z=184.0002$

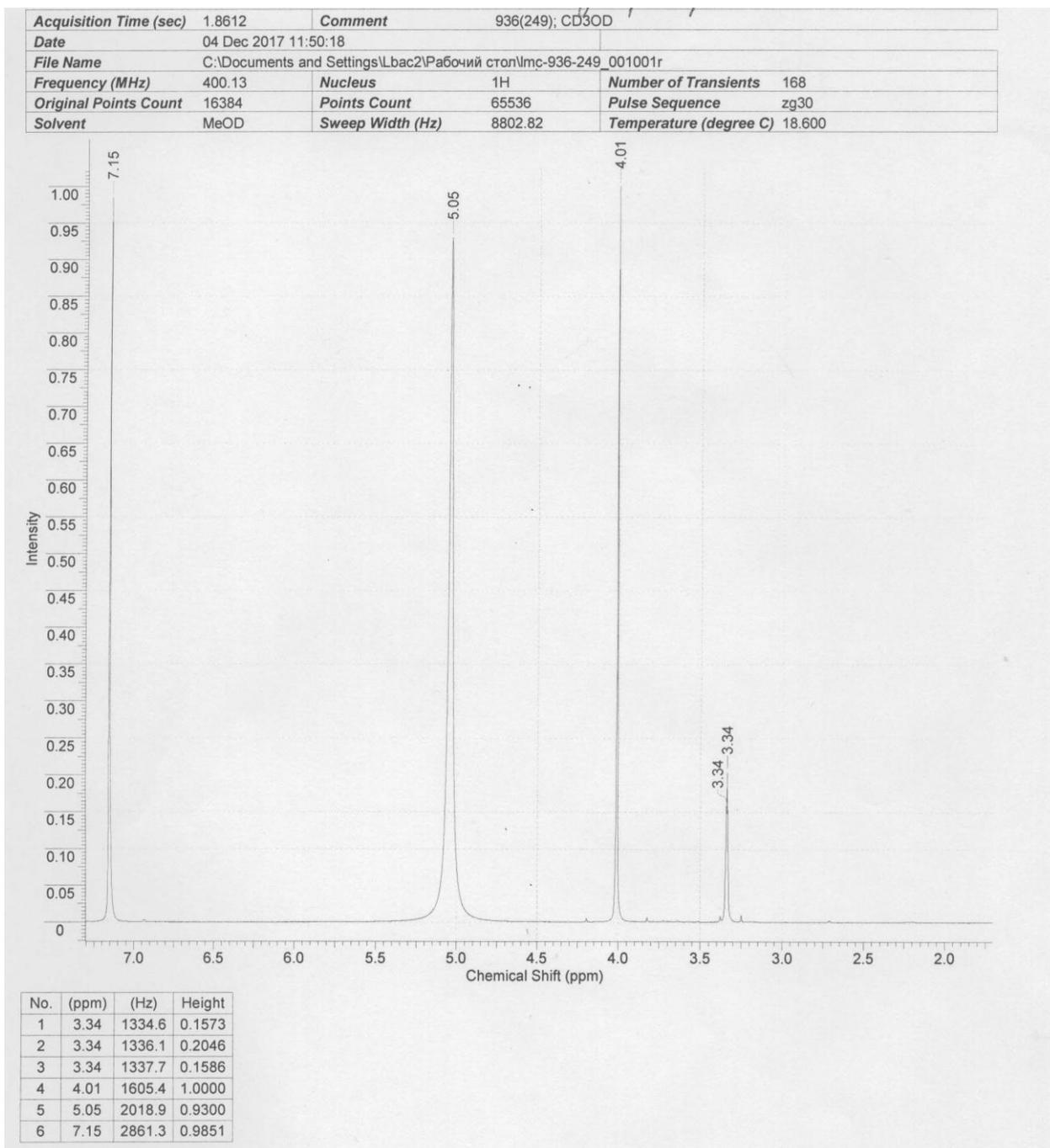
Измеренное значение  $m/z= 184.0006$

Элементный состав RDB Ошибка (ppm)

C7 H4 O6 6.0 1.959

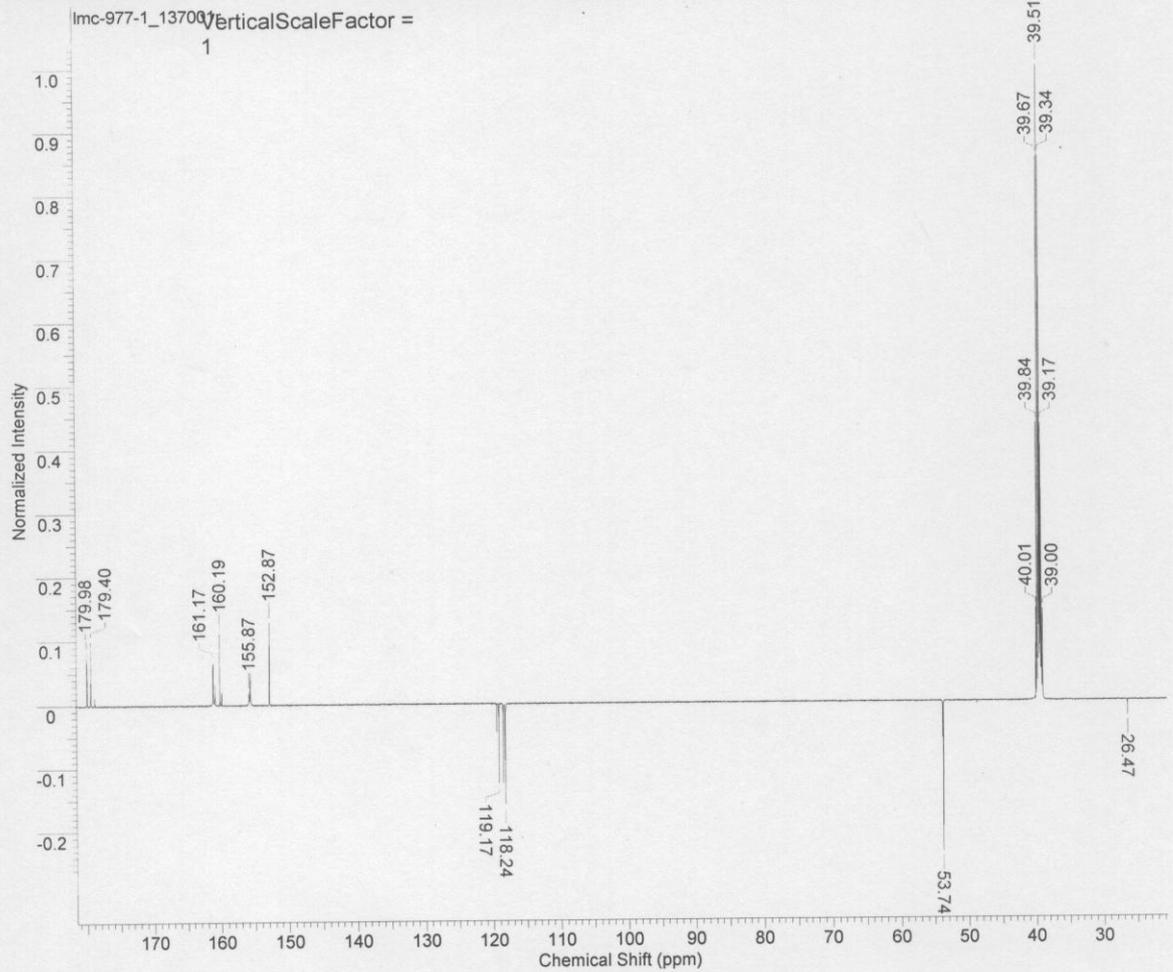
Аналитические и спектральные исследования выполнены в Химическом Сервисном Центре коллективного пользования СО РАН.

ЯМР  $^1\text{H}$ -спектр (в дейтерированном метаноле) 4-оксо-4Н-пиран-2,6-  
дикарбоновой кислоты



ЯМР  $^{13}\text{C}$  спектр 4-оксо-4Н-пиран-2,6-дикарбоновой кислоты

Acquisition Time (sec)	1.0813	Comment	977 - 1; DMSO/D6	
Date	06 Sep 2018 03:12:00	Date Stamp	06 Sep 2018 03:12:00	
File Name	C:\Documents and Settings\lbac2\Рабочий стол\lmc-977-1_137001r			
Frequency (MHz)	125.76	Nucleus	$^{13}\text{C}$	Number of Transients
Origin	spect	Original Points Count	32768	Owner
Points Count	131072	Pulse Sequence	jmod	Receiver Gain
SW(cyclical) (Hz)	30303.03	Solvent	DMSO-d6	Spectrum Offset (Hz)
Sweep Width (Hz)	30302.80	Temperature (degree C)	20.200	



No.	(ppm)	(Hz)	Height
1	26.47	3329.3	-0.0248
2	39.00	4905.2	0.1418
3	39.17	4926.2	0.4349
4	39.34	4947.2	0.8564
5	39.51	4968.3	1.0000
6	39.67	4989.1	0.8544
7	39.84	5010.1	0.4349
8	40.01	5031.2	0.1434
9	53.74	6758.6	-0.2382
10	118.24	14869.8	-0.1603
11	119.17	14987.1	-0.1264
12	152.87	19224.4	0.1275
13	155.87	19602.2	0.0195
14	160.19	20144.5	0.1111
15	161.17	20268.7	0.0658
16	179.40	22561.4	0.0996
17	179.98	22633.6	0.0808

**ПРИЛОЖЕНИЕ № 5**

Копия патента и акта внедрения

## Копия патента

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2673537

**СРЕДСТВО ДЛЯ СТИМУЛЯЦИИ РОСТА КЛЕТОК  
ГРАНУЛОЦИТАРНОГО И ЛИМФОИДНОГО РЯДА В  
КОСТНОМ МОЗГЕ И РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ  
И СПОСОБ ЕГО ПОЛУЧЕНИЯ**

Патентообладатели: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Сибирский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России) (RU), Авдеева Елена Юрьевна (RU), Скороходова Марина Геннадьевна (RU), Решетов Ярослав Евгеньевич (RU), Суходоло Ирина Владимировна (RU), Порохова Екатерина Даниловна (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2017117742

Приоритет изобретения 22 мая 2017 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

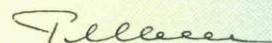
Российской Федерации 28 ноября 2018 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 22 мая 2037 г.



Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

 Г.П. Ивлиев

## Копия акта внедрения

Минздрав России

Федеральное государственное бюджетное  
образовательное учреждение высшего образования  
«Сибирский государственный медицинский  
университет» Министерства здравоохранения  
Российской Федерации  
(ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России)  
Московский тракт, д. 2, г. Томск, 634050  
Телефон (3822) 53 04 23;  
Факс (3822) 53 33 09  
e-mail: office@ssmu.ru  
http://www.ssmu.ru  
ОКПО 01963539 ОГРН 1027000885251  
ИНН 7018013613 КПП 701701001

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по учебной работе

д-р мед. наук, профессор

А.Г. Мирошниченко

2020



№ \_\_\_\_\_  
На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

### АКТ

внедрения в учебный процесс кафедры фармацевтического анализа результатов диссертационной работы Решетова Ярослава Евгеньевича на тему «Соссюрея спорная (*Saussurea controversa* DC.) – перспективный источник средства для лечения остеомиелита», представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя – заведующего кафедрой фармацевтического анализа, д-ра фарм. наук Белоусова М.В. и членов: доцента кафедры фармацевтического анализа, канд. фарм. наук Кадыровой Т.В., доцента кафедры фармацевтического анализа, канд. фарм. наук Каминского И.П. удостоверяем, что предложенная Решетовым Я.Е. в проекте нормативной документации «Соссюреи спорной листа» методика количественного определения флавоноидов методом спектрофотометрии внедрена и используется в процессе обучения ординаторов кафедры фармацевтического анализа в разделе «Спектральные методы анализа».

Председатель

заведующий кафедрой фармацевтического анализа,  
д-р фарм. наук

Белоусов М.В.

Члены комиссии

доцент кафедры фармацевтического анализа,  
канд. фарм. наук

Кадырова Т.В.

доцент кафедры фармацевтического анализа,  
канд. фарм. наук

Каминский И.П.