

Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего
профессионального образования
«Омская государственная медицинская академия»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Погодин Илья Сергеевич

ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СОСЮРЕИ ГОРЬКОЙ КАК
ИСТОЧНИКА БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ

Специальность 14.04.02 – фармакогнозия, фармацевтическая химия

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Научный руководитель:
кандидат фармацевтических наук,
доцент Е. А. Лукша

Омск – 2014

СОДЕРЖАНИЕ

Список сокращений.....	4
Введение.....	5
ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	
РАСТЕНИЙ РОДА <i>SAUSSUREA</i> DC. (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ).....	11
1.1. Исторические аспекты изучения рода <i>Saussurea</i> DC.....	11
1.2. Систематическое положение рода <i>Saussurea</i> DC.....	14
1.3. Распространение рода <i>Saussurea</i> DC. на территории Сибири.....	16
1.4. Химический состав рода <i>Saussurea</i> DC.	25
1.5. Использование растений рода <i>Saussurea</i> DC. в медицине.....	27
1.6. Ботаническое описание и фитоценотическая приуроченность соссюреи горькой (<i>Saussurea amara</i> (L.) DC.)	30
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКИ	
ИССЛЕДОВАНИЯ.....	34
2.1. Характеристика объектов исследования.....	34
2.2. Методики морфологического и микроскопического исследования	34
2.3. Методики ресурсоведческих исследований.....	35
2.4. Методики качественного и количественного анализа биологически активных веществ.....	36
2.5. Методики товароведческого исследования.....	59
2.6. Методики фармакологических исследований.....	60
2.7. Валидационная оценка аналитических методик.....	65
2.8. Методы статистической обработки результатов исследований.....	66
ГЛАВА 3. ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ	
АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ СОССЮРЕИ ГОРЬКОЙ.....	67
3.1. Качественное обнаружение групп биологически активных веществ.....	67
3.2. Количественное определение БАВ.....	82

ГЛАВА 4 ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИЗВЛЕЧЕНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ СОССЮРЕИ ГОРЬКОЙ.....	89
4.1. Исследование острой токсичности водно-спиртовых извлечений соссюреи горькой	89
4.2 Исследование специфической активности водно-спиртовых извлечений соссюреи горькой.....	91
ГЛАВА 5. ОЦЕНКА РЕСУРСНЫХ ЗАПАСОВ И МОРФОЛОГО- АНАТОМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОССЮРЕИ ГОРЬКОЙ.	97
5.1. Ресурсоведческие исследования соссюреи горькой на территории Омской области.....	97
5.2. Морфолого-анатомическое исследование соссюреи горькой.....	98
ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА ПРОЕКТА ФАРМАКОПЕЙНОЙ СТАТЬИ «СОССЮРЕИ ГОРЬКОЙ ТРАВА».....	106
6.1. Разработка показателей ФС «внешние признаки» и «микроскопия»	106
6.2. Разработка методик качественного обнаружения сесквитерпеновых лактонов и флавоноидов в траве соссюреи горькой	108
6.3. Разработка методик количественного определения сесквитерпеновых лактонов и флавоноидов в траве соссюреи горькой.....	110
6.4. Определение числовых показателей травы соссюреи горькой.....	126
6.5. Обоснование времени заготовки и сроков хранения травы соссюреи горькой.....	128
Выводы.....	132
Список используемой литературы.....	134
Приложения	151

Список сокращений:

CCl₄ – тетрахлорметан;
АЛАТ – аланинаминотрансфераза;
АСАТ – аспартатаминотрансфераза;
АТЕ – административно-территориальная единица;
БАВ – биологически активные вещества;
БЗ – биологический запас;
БСФ – бромсульфалеин;
БХ – хроматография на бумаге;
ВЕОЗ – возможный ежегодный объем заготовки;
ВРПС – водорастворимые полисахариды;
ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография;
ГОСТ – государственный отраслевой стандарт;
ГСО – Государственный стандартный образец;
ГФ – Государственная фармакопея;
Гц А – гемицеллюлоза А;
Гц В – гемицеллюлоза В;
ИК – инфракрасная спектроскопия;
ИЭ – интенсивности;
КХ – колоночная хроматография;
ЛПВП – липопротеиды высокой плотности;
ЛРС – лекарственное растительное сырье;
ЛС – лекарственное средство;
ОБ – общий белок;
ОСТ – отраслевой стандарт;
ОФС – общая фармакопейная статья;
ОХ – общий холестерин;
ПВ – пектиновые вещества;
ПЗС – плотность запаса сырья;
ПСК – полисахаридный комплекс;
РСО – рабочий стандартный образец;
СФ – спектрофотометрия, спектрофотометр;
т.н. – точная навеска;
ТСХ – хроматография в тонком слое сорбента;
УФ – ультрафиолетовый;
ФГ – фибриноген;
ФКК – фенолкарбоновые кислоты;
ФС – фармакопейная статья;
ЭЗС – эксплуатационный запас сырья.

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность. Одной из актуальных задач фармации в современном мире является поиск перспективных источников лекарственных средств растительного происхождения. По данным Всемирной организации здравоохранения, лекарственные средства растительного происхождения для лечения и профилактики различных заболеваний используют около 80 % населения [112].

Соссюрея горькая (*Saussurea amara* (L.) DC.) – многолетнее травянистое растение, произрастающее на территории Сибири [102]. В народной и традиционной медицине надземную часть соссюреи горькой используют при инфекционных заболеваниях, злокачественных новообразованиях, диарее, лихорадке, эпилепсии, ревматизме, расстройстве желудка и кровоизлияниях. В эксперименте обнаружена туберкулоцидная, антипротозойная, противоопухолевая, антибактериальная, желчегонная активность извлечений соссюреи горькой [92]. Таким образом, соссюрея горькая представляет практический интерес для внедрения в медицинскую практику в качестве источника биологически активных веществ.

Детальный обзор литературных сведений показывает, что химический состав соссюреи горькой изучен недостаточно, что затрудняет разработку методов стандартизации лекарственного сырья и препаратов и ограничивает применение данного растения в официальной медицине.

Цель работы: Целью настоящего исследования явилось фитохимическое, морфолого-анатомическое и фармакологическое изучение соссюреи горькой для обоснования возможности внедрения в медицинскую практику в качестве источника биологически активных веществ.

Для достижения поставленной цели были сформулированы следующие **задачи:**

- На основании изучения данных научной литературы о видах растений рода *Saussurea* DC., произрастающих на территории Сибири, обосновать перспективность фармакогностического изучения соссюреи горькой.

- Провести фитохимический анализ и определить компонентный состав доминирующих групп биологически активных соединений надземной части соссуреи горькой.
- Провести фармакологическое исследование извлечений, полученных из надземной части соссуреи горькой.
- Провести оценку запасов сырья соссуреи горькой на территории Омской области и изучить морфолого-анатомическое строение надземной части соссуреи горькой.
- Разработать нормативную документацию, регламентирующую качество лекарственного растительного сырья: проект фармакопейной статьи «Соссуреи горькой трава» и Инструкцию по заготовке, сушке и хранению травы соссуреи горькой.

Научная новизна.

В результате фитохимического исследования установлен компонентный состав основных групп биологически активных веществ (БАВ) соссуреи горькой. Определено количественное содержание в растении полисахаридов, аминокислот, аскорбиновой кислоты, растительных пигментов (каротиноиды и хлорофиллы), сесквитерпеновых лактонов, флавоноидов, фенолокислот, кумаринов, дубильных веществ.

Впервые в извлечениях из надземной части соссуреи горькой, собранной на территории Сибири, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) идентифицировано: десять соединений фенольной природы – кумарины (умбеллиферон), флавоноиды (лютеолин, лютеолин-7-гликозид, апигенин, космосиин), фенолокислоты (кофейная, хлорогеновая, галловая, сиреневая, феруловая); три соединения относящихся к сесквитерпеновым лактонам (гроссгемин, репин и цинаропикрин).

Впервые проведено изучение накопления флавоноидов и сесквитерпеновых лактонов в траве соссуреи горькой по фазам вегетации и определены оптимальные сроки заготовки сырья. Установлен срок хранения для сырья соссуреи горькой.

В эксперименте на животных установлено, что спиртовые извлечения из травы сосюреи горькой по степени воздействия на организм относятся к 4 классу токсичности ($LD_{50} > 5,0$ г/кг). При проведении скрининговых испытаний на специфическую фармакологическую активность извлечений из травы сосюреи горькой установлено наличие противоописторхозной и гепатопротекторной активности.

На основании морфолого-анатомического исследования надземной части сосюреи горькой определены макро- и макропризнаки сырья, которые позволяют их использовать для оценки подлинности сосюреи горькой.

Разработаны методики качественного обнаружения и количественного определения сесквитерпеновых лактонов в пересчете на цинаропикрин (методом высокоэффективной жидкостной хроматографии), методики качественного обнаружения (методом хроматографии в тонком слое сорбента) и количественного определения флавоноидов в пересчете на лютеолин (методом дифференциальной спектрофотометрии) в траве сосюреи горькой.

Определены числовые показатели, регламентирующие качество сырья.

Для определения возможности использования сосюреи горькой в медицине впервые проведена оценка запасов сырья сосюреи горькой на территории административных районов Омской области, принадлежащих к лесостепной и степной зоне. В результате установлено, что ежегодный объем заготовки составляет не менее 40 тонн травы сосюреи горькой.

Практическая значимость.

На основании данных фитохимического, фармакологического и товароведческого анализа разработаны:

- проект ФС «Сосюреи горькой трава»;
- «Инструкция по заготовке и сушке травы сосюреи горькой»;
- Методические рекомендации «Количественное определение флавоноидов в траве сосюреи горькой»;
- Методические рекомендации «Количественное определение сесквитерпеновых лактонов методом ВЭЖХ в траве сосюреи горькой».

Разработанные методические рекомендации внедрены в рабочий процесс Территориального центра по сертификации и контролю качества лекарственных средств Омской области, г. Омск, а также в учебный процесс кафедры биологической химии с курсом медицинской, фармацевтической и токсикологической химии ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В. Ф. Войно-Ясенецкого», кафедры фармакогнозии с курсами ботаники и экологии ГБОУ ВПО «Сибирский государственный медицинский университет», кафедры фармации ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия».

Основные положения, выносимые на защиту.

- результаты фитохимического исследования травы сосюреи горькой;
- данные по изучению фенольных соединений и сесквитерпеновых лактонов;
- методики количественного определения флавоноидов и сесквитерпеновых лактонов;
- результаты морфолого-анатомических исследований с установлением диагностических признаков сырья;
- результаты предварительных фармакологических исследований сосюреи горькой.

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук.

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научных исследований ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Минздрав России, тематикой проблемной комиссии «Актуальные проблемы лекарствоведения в Сибирском регионе».

Личный вклад автора. Автор принимал участие в определении цели исследования и путей ее реализации, планировании и выполнении экспериментов. Автором проводились фитохимические, морфолого-анатомические и ресурсоведческие виды исследований, анализ, статистическая обработка, научное обоснование и обобщение полученных результатов. При изучении

фармакологических свойств, выполненных в соавторстве, использованы результаты исследования с долей личного участия автора 80 %.

Апробация полученных результатов. Основные положения работы доложены и обобщены на научно-практических конференциях: 66-ой и 68-ой региональной конференции по фармации и фармакологии «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» (Пятигорск, 2011, 2013); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 45-летию фармацевтического факультета КГМУ (Курск, 2011); III Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы фармацевтической науки и практики» (Владикавказ, 2012); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 10-летию фармацевтического факультета ОмГМА (Омск, 2013); 1st International Scientific Conference «Science progress in European countries: new concepts and modern solutions» (Германия, Штутгарт, 2013).

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют формуле специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия. Результаты проведенного исследования соответствуют области исследования специальности, конкретно пунктам 2,3 и 6 паспорта фармацевтическая химия, фармакогнозия.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 работ, в том числе 4 статьи в изданиях Перечня ВАК.

Благодарность. Автор выражает глубочайшую благодарность и признательность заместителю министра здравоохранения Омской области, начальнику управления по фармацевтической деятельности и производству лекарств Людмиле Владимировне Шукиль за помощь в составлении и внедрении методических рекомендаций; заведующему лабораторией фармакологии кровообращения НИИ фармакологии СО РАМН (Томск), профессору Марку Борисовичу Плотникову; профессору СибГМУ (Томск) Ефиму Авраамовичу Краснову; старшему лаборанту гербария ТГУ имени П.Н. Крылова (Томск) Наталье Виллибальдовне Курбатской; старшему научному сотруднику

лаборатории химии терпеноидов АО «МНПХ «Фитохимия» (Караганда) Ивасенко Светлане Александровне.

Объем и структура диссертационной работы. Материалы исследования изложены на 150 страницах машинописного текста. В тексте приведено 31 таблица и 20 рисунков. Библиографический указатель включает 173 источников литературы, из них зарубежной – 51.

Диссертационная работа состоит из введения, шести глав, выводов, списка использованной литературы и приложений.

ГЛАВА 1. СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ РАСТЕНИЙ РОДА *SAUSSUREA* DC. (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

1.1. Исторические аспекты изучения рода *Saussurea* DC.

Род *Saussurea* DC. является одним из крупнейших родов семейства сложноцветных (*Asteraceae*) и объединяет более 400 видов. Род выделен в самостоятельный таксон выдающимся французским ботаником О. П. Декандром в 1810 году и назван в честь двух натуралистов отца и сына Соссюр (*Saussure*) [60].

Впервые растения рода *Saussurea* DC. были описаны И.Г. Гмелиным (1749) во втором томе «*Flora Sibirica*» и отнесены автором к роду *Cirsium Hill* [140]. Карл Линней, автор биномиальной номенклатуры, относил виды соссюрей к роду *Serratula* [164].

Новый род *Saussurea* DC. Декандоль привел в своей первой монографии, посвященной ревизии сложноцветных («*Observations sur les plantes Composees ou Syngeneses*»), представленной Французскому институту 18 января 1808 г. Она была опубликована лишь в 1810 г. в трудах Парижского музея естественной истории. В монографии рода *Saussurea* Декандоль сравнивает новый, установленный им род с родами *Serratula* L. и *Cirsium Hill*. Род *Saussurea* DC., по автору, отличается от *Serratula* L. наличием перистых щетинок хохолка, а от *Cirsium Hill*. отсутствием колючей обертки. Кроме того, анализируются некоторые другие генеративные и вегетативные признаки и приводятся отличия рода *Saussurea* DC. от близких родов, по Декандолю родственных ему, например *Leuzea* DC., *Heterocoma* DC. и др.

Вслед за Декандром значительный вклад в изучение видового состава соссюрей внес К. Ф. Ледебур. По результатам флористических исследований Алтая и Восточного Казахстана, проведенных в 1829-1831 годы, он провел инвентаризацию видового состава соссюрей России. Первая работа Ледебуря, «*Icones plantarum novarum vel imperfecte cognitarum, floram rossicam, imprimis altaicam illustrantes*», (1829, 1833), охватила 25 видов соссюрей. Среди них, наряду с некоторыми старыми видами, установленными Декандром, приведено

множество описаний неизвестных представителей рода, преимущественно сибирских.

К.Ф. Ледебур выделил 6 групп видов на основе следующих главнейших признаков:

- две группы видов выделены по взаимоотношению длины листочков обертки. Одна из них имеет наружные листочки обертки, по длине почти равные внутренним, у второй наружные листочки обертки значительно более короткие, чем внутренние, т. е. обертка у них ясно черепитчатая;
- две группы видов различаются по основным чертам базальных придатков пыльников. Первая из них отличается наличием двущетинковых придатков, вторая – клочковато-шерстистыми или пучковато-реснитчатыми придатками;
- две группы видов выделены по наличию или отсутствию придатков на верхушке листочков обертки. Представители первой группы характеризуются наличием пленчатых придатков, представители второй не имеют их.

Необходимо отметить еще одну монографию Декандоля «*Prodromus regni vegetabilis*» (De Candolle, 1838), которая охватывает все тогда известные в мировом масштабе виды соссюрей. В этой монографии представители соссюрей распределены уже по двум родам: *Saussurea* DC. и *Aplotaxis* DC.

Род *Saussurea* Декандалем разделен на 3 секции:

- *Lagurostemon* (Cass.) DC. (9 видов, не считая разновидностей);
- *Benedictia* DC. (19 видов, исключая разновидности);
- *Theodorea* (Cass.) DC. (11 видов).

В роде *Aplotaxis* выделены 3 таксона:

- *Frolovia* DC., со стеблем с одиночными корзинками (7 видов);
- *Cirsioides* DC., с многочисленными корзинками в рыхлых щитках (12 видов, исключая разновидности);
- *Eriocoryne* (Wall.) DC., с многочисленными корзинками в скученных щитках (4 вида).

В 1856 г. обзор видов *Saussurea* DC., обитающих в Прибайкалье, Забайкалье и Даурии, был приведен в работе Н. С. Турчанинова [138]. 20 видов,

охватываемых этой сводкой, распределены по 3 секциям: *Lagurostemon* Cass., *Benedictia* DC., *Theodorea* DC.

Необходимо отметить вклад английских ботаников Ч. Б. Кларка (С. В. Clarke) и Дж. Д. Гукера (J. D. Hooker), которые во второй половине XIX века проводили изучение растений рода *Saussurea* DC., собранных на территории Индии и Гималаев.

Ч. Б. Кларк распределил 33 принимаемых им вида индийских соссюрей по 9 секциям, сравнительно небольшим по объему, и описал 10 новых видов.

Дж. Д. Гукер расчленил род *Saussurea* DC. на 2 подрода: *Eusaussurea* Hook. f., к которому отнес 6 секций с 35 видами, и *Eriocoryne* (DC.) Hook; f., без секций, с 4 видами [139].

Значительный вклад в систематику рода *Saussurea* DC. внес японский ботаник С. Китамура [153]. После обработки коллекции соссюрей, собранных сотрудниками Гималайской экспедиции, организованной университетом в Киото, он предложил новую систему рода *Saussurea* DC. В роде *Saussurea* DC. автор выделяет 10 секций, таких как:

- Sect. *Saussurea*, в которой выделяются подсекции:
 - subsect. *Saussurea*;
 - subsect. *Cyathidium* Endlich.;
- Sect. *Lagurostemon* (Cass.) DC. p. p., 1838;
 - subsect. *Rosulascentes* Kitam.;
 - subsect. *Acaules* Clarke in Kitam.;
- Sect. *Jacea* Lipsch., 1954;
- Sect. *Nepalenses* Kitam.;
- Sect. *Depressae* Clarke;
- Sect. *Lappa* Hook. f.;
- Sect. *Elatae* Hook. f., 1881 p. max. p., emend. Kitamura;
- Sect. *Frolovia* (DC.) Kitam., 1937;
- Sect. *Amphilaena* Stschegl., 1848;
- Sect. *Eriocoryne* (DC.) Kitam. comb. nova.

Наиболее полно род *Saussurea* DC. описал монограф этого рода С. Ю. Липшиц [60, 61]. Предложенная им система рода *Saussurea* DC. основывается на изучении значительного количества гербарного материала, представленного в различных ботанических организациях мира (Королевский ботанический сад, г. Эдинбург; Национальный гербарий США, г. Вашингтон; Ботанический музей, г. Гетеборг; Институт ботаники академии наук Китая, г. Пекин; Ботанический институт им. В.Л. Комарова, г. Санкт-Петербург и др.).

Система, предложенная С.Ю. Липшицем, опирается на совокупность морфологических, генетических, гибридологических и географических методов филогенетической систематики растений. Данная система привлекает возможностью прогнозирования свойств мало изученных видов, что особенно важно при поиске природных источников биологически активных соединений.

Таким образом, история изучения рода *Saussurea* DC. насчитывает более 250 лет, при этом систематическое положение рода не раз претерпевало значительные изменения, так как ряд авторов строили свои классификации, основываясь на изучении ограниченного количества изученных видов.

Следует отметить что, в современной ботанической номенклатуре принята систематическая характеристика рода *Saussurea* DC., предложенная С. Ю. Липшицем.

1.2. Систематическое положение рода *Saussurea* DC.

Систематическая характеристика рода *Saussurea* DC. представлена в XXVII томе «Флоре СССР» монографом этого рода С. Ю. Липшицем [61].

Род соссюрея, Горькуша – *Saussurea* DC.

DC. in Ann. Mus. Paris, XVI (1810) 198; Benth. et Hook. f. Gen. pl. II (1876) 471; O. Hoffm. in Pflanzenfam. IV, 5 (1894) 320. — *Heterotrichum* MB. Fl. taur.-cauc. III (1819) 55. — *Bennetia* S. F. Gray. Nat. Arr. Brit. Pl. II (1821) 440. — *Lagurostemon* Cass. Dict. sc. nat. LIII (1828) 466; Wydl. in Linnaea, V, 3 (1830) 425. — *Theodorea* Cass. Dict. sc. nat. LIII (1828) 463. — *Eriostemon* Less. Synops. Compos. (1832) 12. — *Aplotaxis* DC. in Guill. Arch. Bot. II (1833) 330; Ej. Prodr. VI (1837) 538. — *Naplotaxis* Endlich. Gen. pl. (1836—1840) 468; Ldb. Fl. Ross. II, 2

(1845—1846) 672. — *Cyathidium* Lindl. in Royle, III. Bot. Himal. (1839) 251. — *Aucklandia* Falc. in Trans. Linn. Soc. XIX (1842) 23. — *Frolovia* (DC.) Lipsch. в Бот. мат. Герб. Бот. инст. АН СССР, XVI (1954) 461.

Многолетние или, реже, двулетние травы, иногда полукустарники; низкие или высокие, ветвистые или простые. Листья очередные, часто более менее кожистые, жесткие или мягкие, цельнокрайние или зубчатые, вырезано-зубчатые, выемчато-лопастные или перистонадрезные, голые или опушенные (иногда шерстисто опушенные); нередко у одного и того же вида могут быть цельнокрайние, вырезные или перистонадрезанные. Корзинки однородные, много- и равноцветковые, собранные в узкощитковидные или в широкометельчатые соцветия, иногда одиночные. Цветки трубчатые обоеполые. Обертка шаровидная, яйцевидная, колокольчатая или цилиндрическая; листочки ее многорядные, обычно черепитчатые, прижатые, или наружные отклоненные или отогнутые; на верхушке острые, заостренные, тупые или притуплённые, чаще без придатков, реже с пленчатыми окрашенными придатками, иногда с травянистыми саблевидными придатками. Цветоложе плоское или выпуклое, густо или рассеянно пленчатое, со свободными пленками или, реже, усаженное желтоватыми сосочками, иногда сросшимися почти до верхушки, у некоторых видов голое. Венчик розовый, пурпуровый, темно-фиолетовый, редко белый, с тонкой трубкой и вздутым зевом, отгиб с середины или ниже – 5-надрезный. Пыльники на верхушке оканчиваются длинными острыми придатками, в основании с двумя щетинками, нижние придатки реснитчатые, волосистые или с пучком шерстистых волосков. Тычиночные нити голые, свободные. Рыльце длинное, на верхушке раздвоенное, ветви его линейные, на верхушке тупые, с тыльной стороны с сосочками. Семянки голые, на верхушке усеченные, иногда с окраиной (коронкой), чаще гладкие, редко, по ребрам, особенно в верхней части, с шипиками; в основании немного сжатые; по форме почти цилиндрические или 4-гранные; по окраске соломенные, бурые, черно-пурпурово-точечные, редко черные, нередко крапчатые. Хохолок однорядный или двойной; наружные

щетинок укороченные, зазубренные или мелкоперистые, легко опадающие; внутренние всегда длинноперистые, в основании сросшиеся в колечко.

Согласно системе, предложенной С. Ю. Липшицем, род *Saussurea* DC. подразделяется на 6 подродов: *Stephanodontos* Lipsch., *Amphilaena* (Stschegl.) Lipsch., *Frolovia* (DC.) Lipsch., *Eriocoryne* Wall. ex DC., *Saussurea*, *Theodorea* (Cass.) Lipsch. В подроде *Saussurea* приняты следующие 6 секций: *Pycnocephala* Lipsch., *Laguranthera* (C. A. Mey.) Lipsch., *Benedictia* DC. (с 2 подсекциями), *Jurineiformes* Lipsch., *Jacea* Lipsch., *Depressae* Clarke [61].

С.Ю. Липшиц выделяет следующие характерные особенности рода *Saussurea* DC.:

1) *Многочисленный видовой и внутривидовой состав рода.* В состав рода *Saussurea* входят 350-400 видов.

2) *Значительный ареал рода.* Отдельные представители рода (например, альпийско-бореальный вид *Saussurea alpina* (L.) DC.) широко распространены, в основном ареал таксонов *Saussurea* DC. приходится на азиатский материк. Максимум числа видов, а также разнообразия жизненных форм их приходится на Гималаи, Центральную и Восточную Азию. Поэтому род *Saussurea* DC. с полным правом может быть отнесен к числу характерных восточноазиатских родов.

3) *Полиморфизм вегетативных и генеративных органов Saussurea DC.*

С. Ю. Липшиц отмечает непостоянство признаков у растений, произрастающих, преимущественно, в суровых условиях альпийского пояса [60].

Все вышеизложенное позволяет сделать вывод, что род *Saussurea* DC. является типичным восточноазиатским родом, находящимся в стадии формирования (о чем свидетельствует полиморфизм органов).

На следующем этапе будет проведен анализ рода *Saussurea* DC. Сибирского региона для обоснования выбора объекта исследования.

1.3. Распространение рода *Saussurea* DC. на территории Сибири

Важнейшими исходными данными, необходимыми для правильной организации рационального использования растительных ресурсов, их охраны и воспроизводства, являются точные сведения об их географическом размещении.

Разносторонний, системный анализ этой информации позволяет принять решение о том, где и в каких соотношениях должны осуществляться заготовительные и природоохранные мероприятия.

Для решения этой задачи был проанализирован конспект флоры Сибири [49, 102]. Список видов рода *Saussurea* DC., с указанием особенностей местообитания во всех административно-территориальных единицах (АТЕ) Сибири РФ, представлен в табл. 1.

Анализ таблицы 1 позволил сделать следующие выводы:

1. На территории Сибири род *Saussurea* DC. представлен 51 видом;
2. На территории изучаемого региона из всех подродов, выделяемых в современной систематической номенклатуре рода *Saussurea* DC., не встречается только подрод *Stephanodontos* Lipsch.;
3. Крупнейшими подродами рода *Saussurea* DC. Сибирского региона являются подроды *Theodorea* (Cass.) Lipsch. и *Saussurea*;
4. Необходимо отметить значительное количество эндемичных видов рода *Saussurea* DC. на территории Сибири (22 вида). Данные виды были исключены для дальнейшего анализа как неперспективные в плане промышленной заготовки сырья.
5. На территории Омской области произрастает 2 вида рода *Saussurea* DC. - *S. amara* (L.) DC. и *S. salsa* (Pall.) Spreng.

Учитывая многочисленность видов изучаемого рода, для оценки сырьевой базы, нами предложен показатель распространенности растительного объекта, который рассчитывали как отношение числа АТЕ, где произрастает объект исследования, к общему количеству АТЕ, выраженное в процентах. Графическая характеристика полученных результатов представлена на рис. 1.

Распространенность растений рода *Saussurea* DC. на территории административно-территориальных единиц Сибири широко варьирует: от 7 % у *Saussurea umbrosa* Kom. до 92 % у *Saussurea amara* (L.) DC. (Рис. 1.).

Распространение видов рода *Saussurea* DC. на территории Сибири.

№	Административно-территориальные единицы РФ Название вида	Тюменская область	Курганская область	Омская область	Новосибирская область	Кемеровская область	Алтайский край	Республика Алтай	Красноярский край	Республика Хакасия	Республика Тува	Забайкальский край	Республика Бурятия	Республика Саха
Подрод <i>Eriocaryne</i> (DC.) Hook. Секция <i>Eriocaryne</i>														
1.	<i>Saussurea glacialis</i> Herd. - Соссюрея ледниковая							+			+			
Подрод <i>Amphilaena</i> (Stschegl.) Lipsch. Секция <i>Amphilaena</i>														
2.	<i>Saussurea dorogostaiskii</i> Palib. - Соссюрея Дорогостайского эндемик								+	+	+		+	
3.	<i>Saussurea orgadayi</i> V. Khan. et Krasnob. - Соссюрея оргаадай эндемик							+			+			
Пород <i>Theodorea</i> (Cass.) Lipsch. Секция <i>Theodorea</i>														
4.	<i>Saussurea alata</i> DC. - Соссюрея крылатая										+		+	
5.	<i>Saussurea robusta</i> Ledeb. – Соссюрея мощная						+							
6.	<i>Saussurea amara</i> (L.) DC. – Соссюрея горькая	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+
7.	<i>Saussurea ceterachifolia</i> Lipsch. – Соссюрея скребницелистная эндемик										+			

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
21.	<i>Saussurea leucophylla</i> Schrenk – Соссюрея белолистная						+	+			+		+	
22.	<i>Saussurea schanginiana</i> (Wydł.) Fisch. ex Herd. – Соссюрея Шангина						+	+	+	+	+	+	+	+
Секция <i>Rosulascentes</i> (Kitam.) Lipsch.														
23.	<i>Saussurea jadrinzevii</i> Kryl. – Соссюрея Ядринцева эндемик						+	+						
Секция <i>Saussurea</i>														
24.	<i>Saussurea acuminata</i> Turcz. – Соссюрея заостренная											+		
25.	<i>Saussurea alpine</i> (L.) DC. – Соссюрея альпийская	+				+		+	+	+	+	+	+	+
26.	<i>Saussurea amurensis</i> Turcz. - Соссюрея амурская											+	+	
27.	<i>Saussurea chamarensis</i> Peschkova – Соссюрея хамарская эндемик												+	
28.	<i>Saussurea congesta</i> Turcz - Соссюрея скученная эндемик										+	+	+	
29.	<i>Saussurea controversa</i> DC. – Соссюрея спорная				+	+	+	+	+	+	+	+	+	
30.	<i>Saussurea czichaczewii</i> Maneev et Krasnob. - Соссюрея Чихачева эндемик										+			
31.	<i>Saussurea denticulata</i> Ledeb. - Соссюрея мелкозубчатая эндемик								+			+	+	
32.	<i>Saussurea dubia</i> Freyn – Соссюрея сомнительная											+		+
33.	<i>Saussurea elongata</i> DC. - Соссюрея вытянутая											+	+	+

Продолжение таблицы 1

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
34.	<i>Saussurea foliosa</i> Ledeb. - Соссюрея густолистная эндемик						+	+	+	+	+	+		
35.	<i>Saussurea hypargyrea</i> Lipsch. et Vved. - Соссюрея серебристо-белая эндемик													+
36.	<i>Saussurea latifolia</i> Ledeb. - Соссюрея широколистная				+	+	+	+	+	+	+	+	+	
37.	<i>Saussurea lenensis</i> M. Pop. et Lipsch. Соссюрея ленская эндемик											+	+	+
38.	<i>Saussurea neoserrata</i> Nakai – Соссюрея новопильчатая											+	+	
39.	<i>Saussurea oxyodonta</i> Hull. – Соссюрея острозубчатая													+
40.	<i>Saussurea parviflora</i> (Poir.) DC. – Соссюрея мелкоцветковая	+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
41.	<i>Saussurea parviflora subsp. purpurata</i> (Fisch. ex Herd.) Lipsch. – Соссюрея пурпуровая эндемик								+	+		+	+	
42.	<i>Saussurea poljakowii</i> Glenn. – Соссюрея Полякова эндемик											+	+	
43.	<i>Saussurea pseudoalpina</i> Simps. – Соссюрея ложноальпийская						+	+			+			
44.	<i>Saussurea pseudoangustifolia</i> Lipsch. – Соссюрея ложноузколистная эндемик											+		+
45.	<i>Saussurea pseudosquarrosa</i> M. Pop. et Lipsch. – Соссюрея ложнооттопыренная эндемик											+		+
46.	<i>Saussurea sajanensis</i> Gudoschn. – Соссюрея саянская эндемик								+	+				

Продолжение таблицы 1

	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
47.	<i>Saussurea squarrosa</i> Turcz. – Соссюрея оттопыренная эндемик												+	
48.	<i>Saussurea stubendorffii</i> Herd. – Соссюрея Штубендорфа						+	+	+	+	+	+	+	+
49.	<i>Saussurea subacaulis</i> (Ledeb.) Serg. – Соссюрея бесстебельная эндемик						+	+	+	+	+	+	+	
50.	<i>Saussurea tilesii</i> (Ledeb.) Ledeb. - Соссюрея Тилезиева	+							+					+
51.	<i>Saussurea umbrosa</i> Кот. - Соссюрея теневая											+		

Анализ таблицы 1 позволяет сделать вывод, что наибольшую распространенность имеют 10 видов рода *Saussurea* DC.: *S. amara* (L.) DC. (**92 %**); *S. parviflora* (Poir.) DC. (**85 %**); *S. alpina* (L.) DC. (**69 %**); *S. latifolia* Ledeb. (**69 %**); *S. controversa* DC. (**69 %**); *S. salicifolia* (L.) DC. (**62 %**); *S. salsa* (Pall.) Spreng. (**62 %**); *S. schanginiana* (Wydł.) Fisch. ex Herd. (**62 %**); *S. stubendorffii* Herd. (**62 %**); *S. baicalensis* (Adams) Robins. (**54 %**).

Базисным вопросом при внедрении в медицинскую практику нового лекарственного растения является сырьевая база, которая определяется возможностью заготовки растительного сырья, т.е. доступностью.

Доступность сырья предопределяется географическим расположением и природно-климатическими условиями, а также наличием и качеством транспортных путей сообщения.

В пределах Сибири насчитывается 10 природных зон и подзон, различающихся природно-климатическими условиями. С севера на юг региона они представлены тундрой, лесотундрой, горной тундрой, северными лесами и редколесьями, тайгой с подразделением ее на подзоны северной, средней и южной тайги; степями и лесостепями, горной тайгой, высокогорьями с альпийскими лугами, горными тундрами и каменистыми вершинами. При этом доступность каждой вышеназванной зоны, без сомнений, существенно отличаются. Наиболее благоприятны в этом плане лесостепная и степная зоны, затем лесная зона, а наименее проходимы, и соответственно, доступны условия горной тайги и высокогорий (альпийский пояс).

Помимо сырьевой обеспеченности, важной составляющей при оценке перспективности внедрения нового лекарственного растения является химический состав БАВ.

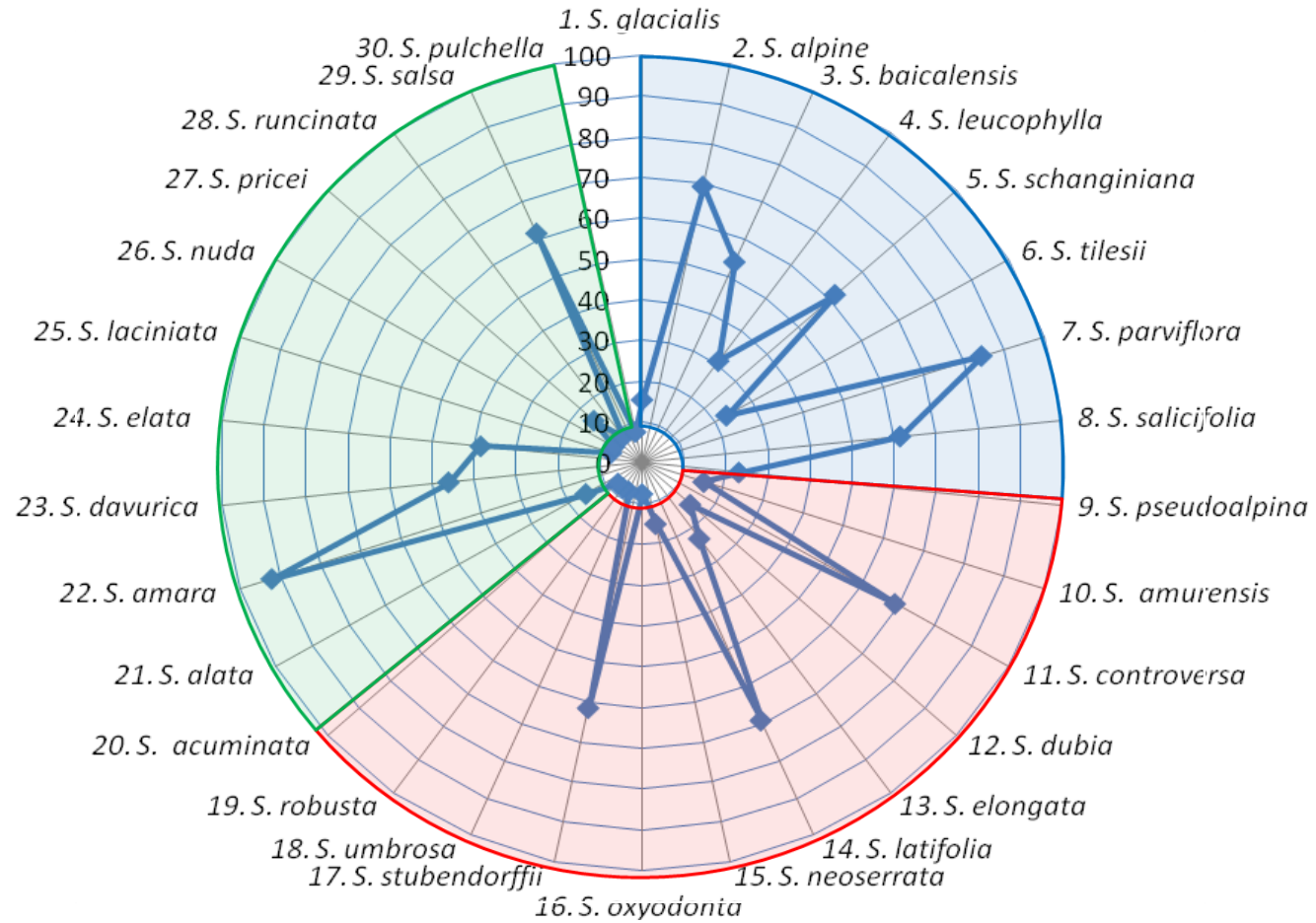


Рис. 1. Оценка распространенности и доступности видов рода *Saussurea* DC. в Сибири (по данным Флоры Сибири, 1997).

Примечание: синий сегмент – альпийский пояс; красный сегмент – лесная зона; зеленый сегмент – лесостепная и степная зона.

1.4. Химический состав рода *Saussurea* DC.

В таблице 2 представлены обобщенные сведения научной литературы о составе БАВ для 10 видов сосюрей, произрастающих на территории Сибири, имеющих наибольший ресурсный потенциал.

Таблица 2

Сведения о химическом составе некоторых видов рода *Saussurea* DC.

№	Название вида	Сведения о химическом составе	Источники литературы
1	2	3	4
1	<i>Saussurea amara</i> (L.) DC.	эфирное масло кардиотонические гликозиды углеводы дубильные вещества антрагликозиды кумарины флавоноиды (лютеолин, генкванин, кверцитрин, апигенина-7-О-гликозид) сесквитерпеновые лактоны (цинаропикрин, дезацилцанаропикрин, цебелин G) тритерпеноиды (таракастерол, таракастерола ацетат) алкалоиды	45 36 84 143, 156 47, 53, 116, 143 143
2	<i>Saussurea parviflora</i> (Poir.) DC.	сесквитерпеновые лактоны (производные эвдесмана) дубильные вещества, флавоноиды, тритерпеноиды (лупеол)	123, 173 84 149
3	<i>Saussurea alpina</i> (L.) DC.	полиацетиленовые соединения: (тридецен-1-пентаин-3,5,7,9,11; тридекадиен-1,11-тетраин-3,5,7,9; тетрадекатетраен-4,6,10,12-ин-8-ол-1, 2цис,8цис-матрикариаэфир) дубильные вещества кумарины флавоноиды (рутин, лютеолин, апигенин) фенолкарбоновые кислоты (галловая, коричная, кофейная кислота)	129, 147 83, 20, 11

Продолжение таблицы 2

1	2	3	4
4	<i>Saussurea latifolia</i> Ledeb.	алкалоиды дубильные вещества кумарины фитозкдизоны (экдистерон) флавоноиды	106 37, 83 84 93 37, 83, 84
5	<i>Saussurea controversa</i> DC.	флавоноиды (кверцетин, рутин, лютеолин, апигенин) тритерпеновые сапонины аскорбиновая кислота фитостерины (β -ситостерол, стигмастерол, кампестерол) фенилпропаноид (сирингин) фенолкарбоновые кислоты (кофейная, галловая, коричная кислота)	9, 19, 166 53 114 166 166 11, 105
6	<i>Saussurea salicifolia</i> (L.) DC.	алкалоиды эфирное масло дубильные вещества сесквитерпеновые лактоны (цинаропикрин, янерин, 19-дезоксиянерин, дезацильнерин, 4-гидрокситиглат дезацильнерина, 11 α ,13-дигидроянерин, 4-гидрокситиглат 11 α ,13-дигидродезацильнерина, 11 α ,13-дигидроцинаропикрин, 4-гидрокситиглат 11 α ,13-дигидродезацильцинаропикрина флавоноиды (кверцетин, гиперозид, кемпферол, апигенин) кумарины (умбеллиферон, скополетин, эскулетин) лигнаны (трахелогенин, арктигенин, матайрезинол)	118 34, 99, 116, 142 116, 133 116 126, 167
7	<i>Saussurea salsa</i> (Pall.) Spreng.	сесквитерпеновые лактоны (цинаропикрин) алкалоиды	57, 89 42, 64, 122
8	<i>Saussurea schanginiana</i> (Wydł.) Fisch. ex Herd.	дубильные вещества, кумарины, флавоноиды алкалоиды	84 9
9	<i>Saussurea stubendorffii</i> Herd.	данные отсутствуют	-
10	<i>Saussurea baicalensis</i> (Adams) Robins.	флавоноиды	6, 19, 20

Опираясь на литературные данные, необходимо сказать, что химический состав видов рода *Saussurea* DC., произрастающих на территории Сибири, изучен недостаточно. В литературе имеются отрывочные сведения, которые сводятся, в основном, к определению групп биологически активных веществ. В исследованных видах сосюрей обнаружены алкалоиды, сесквитерпеновые

лактоны, флавоноиды, кумарины, дубильные вещества, лигнаны, эфирные масла, органические кислоты и тритерпеноиды, фитохимическая характеристика большинства видов неполная, а у некоторых представителей рода практически отсутствует (табл. 2).

Необходимо отметить, что некоторые сведения о химическом составе вызывают сомнения, так, например, данные об обнаружении кардиотонических гликозидов и антрагликозидов [45] в *S. amara* (L.) DC. в повторных исследованиях не подтвердились [36, 84].

Практически во всех описываемых видах сосюрей обнаружены фенольные соединения (флавоноиды, кумарины, фенолкарбоновые кислоты, дубильные вещества), что характерно для всех высших растений. В *S. amara* (L.) DC., *S. salicifolia* (L.) DC., *S. salsa* (Pall.) Spreng., обнаружены сесквитерпеновые лактоны, относящиеся к гваянолидам – цинаропикрин, янерин, цебелин, что, возможно, указывает на хемосистематическое родство этих видов.

Анализируя табл. 2, можно сделать вывод, что наиболее подробно химический состав изучен у сосюрей горькой, сосюрей иволистной и сосюрей спорной.

Наличие комплекса биологически активных веществ обуславливает ценные лекарственные свойства растений рода *Saussurea* DC., что подтверждается их широким применением в народной и традиционной медицине.

1.5. Использование растений рода *Saussurea* DC. в медицине

Как известно, успешный опыт народной медицины является своеобразной стандартной формой прогнозирования эффективности создаваемых фитопрепаратов. Он в немалой степени способствует выбору наиболее перспективных объектов для углубленного химико-фармакологического исследования.

На современном этапе в официальной медицине применяются только корни сосюрей лопуховой *Saussurea costus* (Falc.) Lipsch. (*syn S. lappa* Clarke). Отвар корней и эфирное масло применяются как противовоспалительное средство [124, 169], на территории Российской Федерации это растение не встречается.

При этом растения рода *Saussurea* DC. издавна применялись у народов Дальнего Востока, Сибири, Тибета, Монголии для лечения различных заболеваний.

Проведенные различными авторами предварительные исследования растений рода *Saussurea* DC. флоры Сибири показали, что они представляют интерес для получения лекарственных средств различного фармакологического действия: антибактериального, противоопухолевого, желчегонного, антипаразитного и др.

Данные о применении в народной и традиционной медицине, а также об обнаруженной биологической активности в скрининговых фармакологических исследованиях вышеназванных видов рода *Saussurea* DC. представлены в табл. 3.

Таблица 3

Сведения об использовании растений рода *Saussurea* DC. в народной, традиционной и научной медицине.

№	Название вида	народная и традиционная медицина	научная медицина
1	2	3	4
1	<i>Saussurea amara</i> (L.) DC.	при инфекционных заболеваниях, злокачественных новообразованиях, женских болезнях [91], диарее [101], лихорадке, эпилепсии [36], ревматизме, как жаропонижающее средство, при полиартрите [14], расстройстве желудка и кровотечениях [152]	туберкулоцидная антипротозойная [18], антибактериальная активность [17], [63], [72], желчегонное действие [143], [150] гепатопротекторная активность [111], цитотоксическое и противоопухолевое действие [8]
2	<i>Saussurea parviflora</i> (Poir.) DC.	гемостатическое, жаропонижающее средство, при полиартрите [14], [23]	противоопухолевая активность [173]
3	<i>Saussurea alpina</i> (L.) DC.	данные отсутствуют	антикоагулянтное действие [44], антибактериальная активность [63]
4	<i>Saussurea latifolia</i> Ledeb.	как жаропонижающее, при женских болезнях, ревматоидном артрите, эпилепсии [37], гемостатическое средство [52]	фунгицидные свойства [117], антибактериальная активность [63]

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4
5	<i>Saussurea controversa</i> DC.	гемостатическое средство [21], [44], при метроррагиях, скрофулезе, головной боли [15], [52], глаукоме, болезнях легких, ревматизме, заболеваниях желудка [80], ранозаживляющее средство [113]	антибактериальная активность [63]
6	<i>Saussurea salicifolia</i> (L.) DC.	при заболеваниях органов дыхания, сердечно-сосудистой системы, желчных путей и желудочно-кишечного тракта кровеносной системы, при анорексии, метеоризме, как жаропонижающее и гемостатическое средство [14], [59], [101], при гепатите, холецистите, малярии, энтероколите [59], [100]	гипотензивное, седативное, противосудорожное, противоязвенное действие [100], [116], противотрихомонадная [94], противоопухолевая активность [126], противоописторхозное [116] и гепатопротекторное действие [111]
7	<i>Saussurea salsa</i> (Pall.) Spreng.	гемостатическое, жаропонижающее средство, при ревматоидном артрите [23]	антибактериальная [63], противоописторхозная [89], спермицидная [132] и гепатопротекторная активности [111]
8	<i>Saussurea schanginiana</i> (Wydł.) Fisch. ex Herd.	данные отсутствуют	туберкулоцидная, антипротозойная, антиамебная [17], [95], антибактериальная активность [63]
9	<i>Saussurea stubendorffii</i> Herd.	данные отсутствуют	данные отсутствуют -
10	<i>Saussurea baicalensis</i> (Adams) Robins.	данные отсутствуют	данные отсутствуют

Анализируя таблицу 3 необходимо отметить, что наиболее часто растения рода *Saussurea* DC. в народной и традиционной медицине используются в качестве средств, проявляющих гемостатический, жаропонижающий и противовоспалительный эффект. Опираясь на сведения таблицы 2 и данные литературы, описанные эффекты можно объяснить наличием фенольных соединений, так жаропонижающее и противовоспалительное действие характерно для флавоноидов и фенолкарбоновых кислот [128, 134, 135, 136, 137, 168], а наличие гемостатического действия присуще растительным источникам филлохинона [165].

Анализ данных научной медицины, представленные в таблице 3, свидетельствует, что для большинства растений рода *Saussurea* DC. выявлена антибактериальная, противопаразитарная и противоопухолевая активности. По мнению ряда авторов, данные виды активности характерны для сесквитерпеновых лактонов [99, 127, 157, 160], обнаруженных в составе комплекса биологически активных веществ рода *Saussurea* DC. (табл. 2). При этом в изучаемых видах обнаружены сесквитерпеновые лактоны (табл. 2), которые согласно исследованиям ряда авторов, обладают широким спектром действия, в том числе для них характерны описанные выше биологические эффекты, что объясняет наличие этих видов активности у растений рода *Saussurea* DC.

Важно указать, что для двух изучаемых видов рода *Saussurea* DC.: *S. stubendorffii* Herd. и *S. baicalensis* (Adams) Robins. отсутствует сведения о применении в народной и научной медицине.

Обобщенные данные, приведенные в табл. 3, указывают на значительное многообразие применения растений рода *Saussurea* DC. в народной и традиционной медицине; скрининговые экспериментальные исследования научной медицины показали широкий спектр биологической активности десяти рассматриваемых видов.

Таким образом, по распространённости растения, доступности сырьевой базы, степени изученности химического состава и фармакологических свойств наибольший интерес для внедрения в медицинскую практику представляет *S. amara* (L.) DC. – соссюрея горькая.

1.6. Ботаническое описание и фитоценотическая приуроченность соссюреи горькой (*Saussurea amara* (L.) DC.)

Saussurea amara (L.) DC. 1810 in Ann. Mus. Hist. Nat. (Paris) 16: 200. – *Serratula amara* L. 1753, Sp. Pl. 1: 819. – С. горькая

Все растение сизоватое, обычно шершавое, реже гладкое; стебель прямой, бескрылый, ясно-бороздчатый, в верхней части ветвистый, иногда простой, слегка опушенный, чаще почти голый, 15—60 см высотой, листья, весьма варьирующие по форме и надрезанности края; прикорневые и нижние стеблевые листья с

длинным черешком, эллиптические или продолговато-эллиптические, заостренные, цельнокрайние или выемчато-зубчатые, зубцы неравные, иногда вытянутые; пластинка 5—20 (28) см длины и 1.5— 8 (12) см ширины; стеблевые листья короткочерешковые или сидячие, у основания иногда с ушками, изредка едва избегающие, пластинка их более мелкая, продолговатая или ланцетная, цельнокрайняя; все с обеих сторон зеленые, снизу слегка бледнее и здесь с многочисленными железками, большей частью шершавые от островатых бугорков. Корзинки колокольчатые, 1-1,5 см шир. или более мелкие, цилиндрические, изредка сидят одиночно на вершине стебля, обычно же образуют то более, то менее плотное щитковидно-метельчатое соцветие. Обертка из неравных, черепитчато расположенных листочков, слегка паутинистая, опушенная короткими волосками; наружные листочки ее более мелкие, неясно ланцетные, с темно-зелеными, толстоватыми, эллиптическими или продолговатыми, зубчатыми или 3-надрезанными придатками; средние листочки продолговатые или продолговато-линейные, на верхушке расширенные в округлые, пленчатые, по краям зазубренные, розовоокрашенные придатки, которые в 2—3 раза или едва шире самого листочка; самые внутренние листочки линейные, с узким придатком или почти без него; цветки розовые, около 15 мм длиной, узкая часть трубки почти в полтора или два раза длиннее расширенной ее части с долями отгиба; придатки пыльников коротко и слабо волосистые; ложе соцветия густопленчатое; пленки линейно-шиловидные, блестящие, неравные, до 7 мм длиной; хохолок двойной; наружные щетинки его зазубренные, мелкие, многочисленные, неравные, хотя и ломкие, но остающиеся на семянке; внутренние перистые, около 10 мм дл.; семянка около 3 мм дл., гладкая, без коронки [102].

Важным вопросом при внедрении в медицинскую практику того или иного лекарственного растения является возможная сырьевая база, которая базируется на доступности (возможность заготовки лекарственного растительного сырья без серьезных трудозатрат) и распространении (ареал предлагаемого лекарственного растения).

Доступность для заготовки растительного сырья предопределяется географическим расположением (ареал) и природно-климатическими условиями произрастания лекарственного растения, такими как тип влагообеспечения, типы почв, характерных растительных сообществ, так как, опираясь на эти данные, проводится первый (подготовительный) этап ресурсоведческих исследований, и в дальнейшем организуется заготовка лекарственного растительного сырья.

Ареал сосюреи горькой на территории Российской Федерации охватывает южные районы Западной и Восточной Сибири и подробно описан в главе 1.3, но в изученной нами литературе отсутствует детальная информация об условиях произрастания сосюреи горькой на территории Российской Федерации. Для решения данной проблемы были изучены материалы гербария имени П. Н. Крылова Томского государственного университета.

Проведенные исследования гербарных этикеток показали, что сосюрея горькая имеет четкую приуроченность к солонцеватым и солончаковым лугам и степям, иногда встречается по берегам соленых озер.

Проведенный контент-анализ литературных данных показал, что сосюрея горькая приурочена к фитоценозам разнотравно-осоково-злакового и чиево-бескильницевого травостоя, образованным полевицей тонкой (*Agrostis alba* L.), тростником обыкновенным (*Phragmites australis* Trin.), канареечником птичьим (*Phalaris canariensis* L.), тростянкой овсяницевидной (*Scolochloa festucacea* Link.), осокой пузырчатой (*Carex vesicaria* L.), осокой буроватой (*Carex brunnescens* (Pers.) Poir.), вербейником обыкновенным (*Lysimachia vulgaris* L.), лисохвостом тростниковым (*Alopecurus ventricosus* Pers.), вейником наземным (*Calamagrostis epigeios* (L.) Roth.), пыреем ползучим (*Elytrigia repens* (L.) Nevski), подорожником солончаковым (*Plantago maritima* var. *salsa* (Pall.) Serg.), солонечником двуцветковым (*Galatella biflora* (L.) Ness.), солеросом европейским (*Salicornia europaea* L.), поручейником широколистным (*Sium latifolium* L.), ячменем короткоостым (*Hordeum brevisubulatum* (Trin.) Link.), бескильницей расставленной (*Puccinellia distans* Parl.), подорожником Корнута (*Plantago cornuti* Gouan).

Для растения характерен широкий диапазон влагообеспечения – от сухих степных почв до заболоченной местности, определенный тип почв – солонцы черноземно-луговые и определенный тип растительных сообществ – травяные болота и галофитные луга [56, 69, 71, 90].

Таким образом, доступность сосюреи горькой для заготовки сырья можно характеризовать как удовлетворительную, ареал её достаточно обширен и охватывает практически все южные районы Западной и Восточной Сибири.

Заключение по обзору литературы

Сосюрея горькая (*Saussurea amara* (L.) DC.) распространена на обширной территории, характеризуется доступностью для заготовки сырья, содержит вещества первичного и вторичного метаболизма, применяется в народной и традиционной медицине, в скрининг биологической активности показал наличие фармакологических свойств.

Выбор направления исследования обусловлен хемосистематическим родством растений рода сосюрея: в с. иволистной, с. солончакой и с. горькой обнаружены сесквитерпеновые лактоны, основным компонентом которых является гваянолид цинаропикрин, следовательно, с. горькая потенциально обладает теми же видами фармакологической активности, что и с. иволистная и с. солончаковая.

Из всех видов активности особого внимания заслуживает противоописторхозное действие, так как описторхоз, является самым распространенным гельминтозом, основной очаг которого приходится на Обь-Иртышский бассейн и, учитывая также социальную значимость этого заболевания [12, 32], нами было проведено скрининговое пилотное исследование противоописторхозной активности водно-спиртовых извлечений сосюреи горькой.

Внедрение в медицинскую практику предполагает наличие нормативной документации, для разработки которой необходимо детальное химико-фармакогностическое и фармакологическое изучения сосюреи горькой.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКИ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Характеристика объектов исследования

Объектом исследования служила надземная часть растения семейства сложноцветных соссюрея горькая (*Saussurea amara* (L.) DC.), собранная в период с 2004 по 2012 гг., в фазу цветения на территории Новосибирской, Тюменской, Курганской и Омской областей в пределах естественного ареала. Сушку сырья производили воздушно-теневым способом.

Для фитохимических исследований использовали водные, водно-спиртовые извлечения из надземной части соссюреи горькой, а также хлороформные, этилацетатные и бутанольные фракции, выделенные из суммарных комплексов растения.

Для фармакологических исследований использовали водно-спиртовые извлечения, которые получали лабораторным методом реперколяции [67, 115]. Сгущение полученных извлечений проводили на роторных испарителях ИП-1МЗ ОАО «Химлабприбор» и RE-52AA WT, для дальнейшего высушивания использовали метод конвекционной сушки при температуре, не превышающей 45°C.

При разработке и оформлении проекта ФС на сырье руководствовались отраслевыми стандартами [74, 75, 76, 77] и методическими указаниями Министерства Здравоохранения РФ [97].

2.2. Методики морфолого-анатомического исследования

Морфологические признаки надземной части соссюреи горькой изучали и выявляли невооруженным глазом, а также с помощью стереоскопического микроскопа МБС-10 (увеличение 8x1; 8x2; 8x4) по общепринятым методикам [29, 30, 110].

Микроскопические признаки надземной части исследуемого растения устанавливали на плоскостных микропрепаратах листа с верхней и нижней стороны, элементов цветка, по препаратам поперечных срезов листа и стебля в соответствии с методиками, приведенными в ОФС ГФ XI. Для получения

объективных результатов анализировали не менее десяти препаратов [29, 30, 86, 110] из разных местообитаний.

Присутствие различных включений в тканях растений доказывали проведением общепринятых гистохимических реакций [110, 130].

Препараты изучали под микроскопом МИКМЕД-1 (увеличение 7х1,5х8; 7х1,5х40). Объекты фиксировали цифровым фотоаппаратом «Samsung L-210» и цифровой камерой для микроскопа Levenhuk C310. Снимки обрабатывали на компьютере в программе «GIMP 2.8.».

2.3. Методики ресурсоведческих исследований

Оценку сырьевой базы проводили общепринятыми методами.

На подготовительном этапе составление маршрута обследования территории с целью определения запасов сосюреи горькой проводилось с использованием картографических материалов районов Омской области [4]. Маршрут обследования строился с учетом доступности растительных сообществ с участием сосюреи горькой.

Экспедиционный этап включал определение запасов сырья в различных ценопопуляциях с целью выявления наиболее продуктивных участков заготовки.

Оценку запасов растительного сырья проводили методом конкретных зарослей. Для расчета площади, очертания заросли приравнивались к определенной геометрической фигуре, и рассчитывалась площадь этой фигуры.

Плотность запаса сырья (ПЗС) определялась на учетных площадках размером $1 \times 1 \text{ м}^2$. В пределах каждой заросли было заложено не менее 25 площадок, размещенных на параллельных ходах. Плотность запаса сырья определяли методом модельных экземпляров. В качестве «модели» была выбрана надземная олиственная часть сосюреи горькой. Плотность запаса сырья определялась как средняя величина массы надземной части растения, полученная с единицы площади заросли ($\text{г}/\text{м}^2$).

Биологический запас (БЗ) на конкретных зарослях рассчитывали как произведение средней плотности запаса сырья на общую площадь заросли.

Эксплуатационный запас (ЭЗС) рассчитывали путем вычитания из биологического запаса удвоенной «ошибки» среднего арифметического.

Возможный ежегодный объем заготовки (ВЕОЗ) сырья рассчитывали делением эксплуатационного запаса сырья на оборот заготовки.

Оборот заготовки определялся как сумма продолжительности периода восстановления («отдыха») заросли и года заготовки [7, 38, 40, 81, 85].

2.4. Методики качественного и количественного анализа биологически активных веществ

Для качественного и количественного определения биологически активных веществ в сырье использовали различные методы и приемы фитохимического анализа:

- спектральные – спектрофотометрия в видимой и ультрафиолетовой области спектра (УФ-спектрофотометрия) и спектроскопия в инфракрасной области спектра (ИК-спектроскопия);

- хроматографические – хроматография на бумаге (БХ), хроматография в тонком слое сорбента (ТСХ), колоночная хроматография (КХ), высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ);

- методы избирательной экстракции различными растворителями (в зависимости от природы БАВ);

- титриметрические (окислительно-восстановительное титрование) и гравиметрические методы классической аналитической химии [5, 22, 24, 25, 32, 82, 146, 171, 172].

Расчеты количественного содержания БАВ проводились в пересчете на абсолютно сухое сырье.

Полисахариды. Для проведения *качественных реакций* готовили извлечение по следующей методике: 10,0 г измельченного сырья заливали 100 мл воды и нагревали на водяной бане в течение 10 минут. После охлаждения настой фильтровали и с фильтратом проводили качественные реакции [66, 73, 145]:

а) к 10 мл водного извлечения прибавляли 30 мл 95 % спирта этилового, перемешивали. Образование хлопьевидного осадка свидетельствует о наличии полисахаридов;

б) к 2 мл водного извлечения прибавляли 1 каплю реактива Люголя, появление синего окрашивания свидетельствует о присутствии крахмала;

в) к 1 мл водного извлечения добавляли 4-5 капель концентрированной кислоты серной и 1 каплю α -нафтола. Появление фиолетового окрашивания свидетельствует о присутствии инулина.

Содержание суммы водорастворимых полисахаридов (ВРПС) определяли гравиметрическим методом [66, 73, 145]. Для этого аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 10,0 г (т.н.) помещали в колбу вместимостью 250 мл, прибавляли 100 мл воды очищенной, колбу присоединяли к обратному холодильнику и кипятили при перемешивании на электрической плитке в течение 30 мин. Экстракцию водой повторяли еще четыре раза порциями по 100 мл в течение 30 мин каждый раз. Водное извлечение центрифугировали в лабораторной центрифуге ОПН-8 с частотой вращения 5000 об/мин в течение 10 мин и декантировали в мерную колбу вместимостью 500 мл через пять слоев марли, вложенной в стеклянную воронку диаметром 60 мм, предварительно смоченную водой. Фильтр промывали водой очищенной и доводили объем до метки (раствор А).

25 мл раствора А помещали в пробирку для центрифугирования, прибавляли 75 мл 95 % этанола, перемешивали, подогревали на водяной бане при температуре 60°C в течение 5 мин. Через 30 мин содержимое центрифугировали в лабораторной центрифуге ОПН-8 с частотой вращения 5000 об/мин в течение 30 мин. Надосадочную жидкость фильтровали под вакуумом при остаточном давлении 13-16 кПа через высушенный до постоянной массы при 100-105°C стеклянный фильтр ПОР 16 диаметром 40 мм. Затем осадок количественно переносили на тот же фильтр и промывали 15 мл смеси 95 % этанола и воды (3:1).

Фильтр с осадком высушивали сначала на воздухе, затем при температуре 100-105°C до постоянной массы. Содержание суммы водорастворимых

полисахаридов (X) в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{(m_2 - m_1) \times 500 \times 100 \times 100}{m \times 25 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

m_1 – масса фильтра, в г;

m_2 – масса фильтра с осадком, в г;

m – масса сырья, в г;

W – потеря в массе при высушивании (влажность), в %.

Для более детального изучения полисахаридного комплекса определяли сумму полисахаридов по фракциям [66, 73, 145].

Содержание суммы пектиновых веществ (ПВ) определяли гравиметрическим методом. Для этого остаток сырья после определения суммы полисахаридов обрабатывали экстрагентом (100 мл воды очищенной с 0,4 мл концентрированной кислоты хлористоводородной) на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Раствор фильтровали и охлаждали. Пектиновые вещества осаждали двукратным объемом 95 % этанола. Через 12 часов осадок отфильтровывали на воронке Бюхнера, промывали 50 мл 95 % этанола. Осадок подсушивали и доводили до постоянной массы.

Содержание пектиновых веществ в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{m_1 \times 100 \times 100}{m \times (100 - W)}, \text{ где}$$

m – масса остатка сырья, в г;

m_1 – масса осадка пектиновых веществ, в г;

W – потеря в массе при высушивании (влажность), в %.

Определение содержания гемицеллюлоз проводили следующим методом: остаток сырья экстрагировали 100 мл 10 % водного раствора щелочи при температуре 20°C в течение 24 часов на встряхивающем аппарате. После этого полученное извлечение фильтровали через бумажный фильтр и добавляли 40 мл 50 % кислоты уксусной для осаждения гемицеллюлозы А (Гц А). В фильтрате

двукратным объемом 95 % этанола осаждали гемицеллюлозу В (Гц В). Осадок подсушивали при температуре 100-105°C и доводили до постоянной массы.

Содержание гемицеллюлозы А в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{m_1 \times 100 \times 100}{m \times (100 - W)}, \text{ где}$$

m – масса остатка сырья, в г;

m_1 – масса осадка гемицеллюлозы А, в г;

W – потеря в массе при высушивании (влажность), в %.

Содержание гемицеллюлозы В в процентах (X) вычисляли по формуле:

$$X = \frac{m_1 \times 100 \times 100}{m \times (100 - W)}, \text{ где}$$

m – масса остатка сырья, в г;

m_1 – масса осадка гемицеллюлозы В, в г;

W – потеря в массе при высушивании (влажность), в %.

Для определения мономерного состава полисахаридного комплекса проводили кислотный гидролиз полисахаридов [66, 145]. Для этого к 0,1 г (т.н.) полисахаридов прибавляли 5 мл 10 % кислоты серной, и растворы помещали в ампулы. Ампулы запаивали и нагревали в сушильном шкафу при температуре 105°C в течение 18 часов. После охлаждения содержимое количественно переносили в мерную колбу на 25 мл и доводили объем до метки раствором серной кислоты (раствор А). Данный раствор служил для качественного обнаружения моносахаридов в полисахаридном комплексе.

Качественный анализ полисахаридных комплексов проводили методом хроматографии в тонком слое сорбента. Для этого к 10 мл раствора А добавляли 5 мл воды очищенной и нейтрализовали сухим натрия карбонатом по универсальной индикаторной бумаге. Раствор фильтровали через бумажный фильтр, промывали водой, и полученный фильтрат упаривали до объема 0,5 мл. Наносили по 0,02 мл на пластины «Сорбфил» (ПТСХ-АФ-А – производитель ЗАО «Сорбполимер») размером 10x10. Гидролизат хроматографировали восходящим методом в системе ацетон-этилацетат-вода (7:2:1). Проявляли анилинфталатом и

нагревали в сушильном шкафу при 100-105°C. Моносахариды идентифицировали по величине R_f и окраске пятен в сравнении со стандартными образцами моносахаридов, таких как глюкоза, глюкуроновая кислота, галактоза, ксилоза, фруктоза [66, 145].

Количественное определение нейтральных сахаров в полисахаридном комплексе проводили методом спектрофотометрии после качественной реакции с кислотой пикриновой в щелочной среде по следующей модифицированной методике [73]: 10 мл гидролизата (аликвота раствора А) нейтрализовали по универсальной индикаторной бумаге 30 %-ным раствором натрия гидроксида. Раствор фильтровали через плотный бумажный фильтр. Затем количественно переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл, и объем доводили до метки (раствор Б). В плоскодонную колбу помещали 1 мл 1 % раствора кислоты пикриновой, 3 мл 20 %-ного раствора натрия карбоната и 1 мл раствора Б (раствор В), кипятили на водяной бане 10 минут, охлаждали и количественно переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл. Объем доводили до метки (раствор Г). Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 460 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 1 см. В качестве раствора сравнения использовали следующий раствор: 1 мл 1 %-ного раствора кислоты пикриновой, 3 мл натрия карбоната, 1 мл воды, нагретой на водяной бане (10 мин.), и доведенный в мерной колбе до 25 мл.

Параллельно измеряли оптическую плотность стандартного раствора глюкозы, который готовили по следующей методике: 0,08 г (т.н.) глюкозы помещают в мерную колбу вместимостью 100 мл и доводят объем раствора водой очищенной до метки, затем 10 мл полученного раствора переносят в мерную колбу вместимостью и доводят водой очищенной до метки 25 мл. Далее к 1 мл раствора прибавляли 3 мл 20 %-ного раствора натрия карбоната и 1 мл 1 %-ного раствора кислоты пикриновой, кипятили на водяной бане (10 мин.) и доводили в мерной колбе до 25 мл.

Содержание суммы моносахаридов рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_1 \times a_0 \times 25 \times 25 \times 25 \times 10 \times 1}{A_0 \times a_1 \times 10 \times 1 \times 100 \times 25 \times 25}, \text{ где}$$

A_1 – оптическая плотность исследуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность стандартного раствора глюкозы;

a – точная масса образца ПСК, г;

a_0 – масса стандартного образца глюкозы, г.

Аминокислоты. Для проведения *качественных реакций* готовили извлечение по следующей методике: около 1,0 г измельченной надземной части сосюреи горькой, заливали 50 мл воды очищенной комнатной температуры, нагревали на кипящей водяной бане в течение 30 мин при перемешивании. Извлечение охлаждали и фильтровали через ватно-марлевый тампон. Полученное извлечение упаривали под вакуумом до 1/5 объема и использовали для проведения качественных реакций:

а) Реакция с нингидрином. Равные объемы извлечения из травы сосюреи горькой и 0,2 %-ного спиртового раствора нингидрина нагревали на водяной бане при температуре 60°C в течение 30 мин. При наличии свободной аминогруппы, принадлежащей предположительно аминокислотам, появляется сине-фиолетовое окрашивание.

б) Подтверждение присутствия аминокислот производили методом хроматографии в тонком слое сорбента в системе растворителей н-бутанол–эфир диэтиловый–кислота уксусная–вода (9:6:3:1). Зоны аминокислот обнаруживали свежеприготовленным 0,2 %-ным спиртовым раствором нингидрина с последующим нагреванием хроматографической пластинки в сушильном шкафу при температуре 60°C в течение 30 мин. Для идентификации аминокислот использовали 0,01 % растворы аминокислот (лизин, гистидин, аргинин, треонин, валин, метионин, изолейцин), которые хроматографировали одновременно с исследуемым извлечением [2, 70].

Количественное определение аминокислот в сосюрее горькой проводили спектрофотометрическим методом, используя реакцию образования окрашенных продуктов аминокислот с нингидрином. Определение проводили на длине волны

570±2 нм на спектрофотометре СФ–2000 [2, 41, 70]. Около 1,0 г (т.н.) измельченного сырья, проходящего сквозь сито с диаметром отверстий 1 мм, заливали 50 мл воды, затем нагревали на водяной бане при температуре 60°C в течение 30 мин. Полученное извлечение фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу на 50 мл, объем доводили водой до метки (раствор А).

1 мл водного извлечения соссуреи горькой помещали в мерную колбу объемом 25 мл и добавляли равное количество свежеприготовленного 0,2 %-ного спиртового раствора нингидрина. Смесь нагревали на водяной бане при температуре 60°C в течение 30 мин. После чего охлаждали до комнатной температуры и доводили до метки водой (раствор Б). Оптическую плотность полученного раствора измеряли на спектрофотометре СФ-2000 при длине волны 570±2 нм (кювета с толщиной слоя 1 см).

В качестве раствора сравнения использовали водное извлечение из соссуреи горькой, приготовленное путем разбавления 1 мл раствора А в мерной колбе до объема 25 мл.

Параллельно измеряли оптическую плотность раствора стандартного образца изолейцина, преобладающего в сумме аминокислот водного извлечения соссуреи горькой, что доказано методом ТСХ по интенсивности окраски пятна на хроматографической пластинке.

Для приготовления раствора стандартного образца изолейцина брали 0,25 г (т.н.) стандартного образца аминокислоты, растворяли в мерной колбе объемом 25 мл. 1 мл этого раствора помещали в мерную колбу объемом 25 мл и добавляли равное количество свежеприготовленного 0,2 %-ного спиртового раствора нингидрина. Смесь нагревали на водяной бане при температуре 60°C в течение 30 мин. После чего охлаждали до комнатной температуры и доводили до метки водой.

Содержание суммы аминокислот (X) в процентах рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_1 \times a_0 \times 50 \times 25 \times 1 \times 100 \times 100}{A_0 \times a_1 \times 1 \times 25 \times 25 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

A_1 – оптическая плотность исследуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность стандартного раствора;

a_1 – навеска сырья, г;

a_0 – масса стандартного образца изолейцина, г.

W – влажность, в %.

Кислота аскорбиновая. Для *качественного определения* использовали метод ТСХ и готовили извлечение по следующей методике: в ступке измельчали 0,5 г травы сосюреи горькой, заливали 5 мл воды очищенной, перемешивали, оставляли на 15 мин и фильтровали. Полученное извлечение наносили капилляром на хроматографическую пластинку «Сорбфил», размером 10x10 рядом с раствором РСО кислоты аскорбиновой, помещали в хроматографическую камеру с системой растворителей этилацетат–кислота уксусная ледяная (8:2). После хроматографирования пластинку высушивали на воздухе и обрабатывали 0,04 %-ным водным раствором натрия 2,6-дихлорфенолиндофенолята ($R_f=0,47$).

Кислота аскорбиновая обнаруживается в виде белого пятна на синем фоне.

Количественное определение кислоты аскорбиновой проводили титриметрическим методом [30]. Метод основан на способности кислоты аскорбиновой восстанавливать натрия 2,6-дихлориндофенолят.

Навеску 20,0 г (т.н.) помещали в фарфоровую ступку, тщательно растирали, постепенно добавляя 300 мл воды, и настаивали 10 минут. Затем смесь тщательно размешивали, и извлечение фильтровали. В коническую колбу вместимостью 100 мл вносили 1 мл полученного извлечения, 1 мл 2 % раствора кислоты хлористоводородной, 13 мл воды, перемешивали и титровали раствором натрия 2,6-дихлорфенолиндофенолята (0,001 моль/л) до появления розовой окраски, исчезающей в течение 30-60 секунд.

Содержание кислоты аскорбиновой (X) в процентах вычисляли по формуле:

$$X = \frac{V \times 0,000088 \times 300 \times 100 \times 100}{a \times (100 - W)}, \text{ где}$$

V – объем раствора натрия 2,6-дихлорфенолиндофенолята, израсходованный на титрование, в мл;

a – масса сырья, в г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, в %;

0,000088 – количество кислоты аскорбиновой, соответствующее 1 мл раствора натрия 2,6-дихлорфенолиндофенолята (0,001 моль/л).

Эфирное масло. *Количественное определение* эфирного масла проводили методом перегонки с водяным паром в приборе Клевенджера по общепринятой методике [29].

Сесквитерпеновые лактоны. *Качественное обнаружение сесквитерпеновых лактонов* проводили методом ИК-спектроскопии и хроматографии в тонком слое сорбента и методом ВЭЖХ.

Для ИК-спектроскопии и ТСХ готовили извлечение по методике, предложенной К.С. Рыбалко [99]: 2,0 г измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 50 мл, прибавляли 25 мл воды, колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на водяной бане при температуре 50-60°C в течение 1 часа. Извлечения охлаждали, фильтровали через бумажный фильтр и экстрагировали хлороформом три раза порциями по 15, 10 и 5 мл соответственно. Растворитель отгоняли под вакуумом, и сухой остаток использовали для проведения качественного анализа:

а) ИК-спектроскопия. 1,5 мг сухого остатка растирали с 0,3 г калия бромида в ступке, затем из смеси прессовали таблетку и подвергали ИК-спектроскопии в области 500-4000 см⁻¹ на ИК-спектрометре INFRALUM FT - 801. Расшифровку полученных спектров проводили согласно справочным данным [39, 103].

б) Хроматографическое определение методом хроматографии в тонком слое сорбента. 0,1 г сухого остатка растворяли в хлороформе и наносили на линию старта пластинки «Сорбфил» размером 10x10 см. Пластинку помещали в камеру и хроматографировали восходящим способом в системе растворителей хлороформ-этанол-этилацетат (8:1:1). Когда фронт растворителей прошел 9 см, пластинку вынимали из камеры и сушили на воздухе до удаления следов растворителей. Затем хроматограмму опускали на 5-10 с в насыщенный раствор калия перманганата и промывали под струей холодной воды. Пятна

сесквитерпеновых лактонов имеют бурую окраску. Идентификацию сесквитерпеновых лактонов проводили по совпадению коэффициента подвижности (R_f) в сравнении со стандартными образцами [51, 99, 141, 171, 172].

в) *Хроматографическое определение сесквитерпеновых лактонов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии* [89, 146, 162, 163].

Извлечение суммы сесквитерпеновых лактонов проводили смесью хлороформ–этанол (в соотношении 4:1) трехкратной экстракцией из измельченного сырья в количестве 50 г (соотношение «сырье/экстрагент» – 1:8 для каждой экстракции) в течение 4 часов с обратным холодильником на водяной бане при температуре 60-70°C. После охлаждения извлечение фильтровали через бумажный фильтр.

Спиртово-хлороформные извлечения объединяли, и растворитель отгоняли на роторном испарителе под вакуумом при температуре 50°C. Сумму экстрактивных веществ при постоянном перемешивании растворяли в 2 частях горячего 96 % этанола и добавляли 1 часть воды очищенной при температуре 70°C и оставляли в темном месте на сутки. Полученный осадок отфильтровывали и еще два раза обрабатывали при указанных условиях. Для отделения пигментов и смол объединенные фильтраты экстрагировали в делительной воронке петролейным эфиром по 30 мл три раза, затем для отделения фракции сесквитерпеновых лактонов обрабатывали хлороформом по 30 мл три раза. Растворитель отгоняли под вакуумом на роторном испарителе, затем досушивали на водяной бане. Полученную сумму сесквитерпеновых лактонов хроматографировали на колонке с силикагелем марки КСК. Элюентом служила смесь петролейного эфира с этилацетатом в соотношении 1:3. Контроль над разделением веществ осуществляли с помощью метода ТСХ на пластинках “Сорбфил” в системе хлороформ-этанол-этилацетат (8:1:1), хроматограммы проявляли насыщенным раствором калия перманганата. Фракции с одинаковой хроматографической картиной объединяли. Растворитель из объединенных фракций отгоняли под вакуумом на испарителе ротационном RE-52AA WT. Полученные сухие остатки объединенных фракций сесквитерпеновых лактонов

сосюреи горькой отвешивали по 0,01 г (т.н.) и растворяли в 5 мл смеси этанол-ацетонитрил в соотношении 4:1 и использовали для хроматографического определения методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Анализ фракций проводили методом ВЭЖХ в АО «НПЦ «Фитохимия» (г. Караганда, Республика Казахстан) на жидкостном хроматографе с диодно-матричным детектором («HEWLETT PACKARD Agilent 1100 Series») в изократическом режиме в следующих условиях:

- аналитическая колонка, заполненная сорбентом Zorbax SB-C18, 4,6 x 150 мм, с размером частиц 5 мкм, размер пор 80 Å;
- состав подвижной фазы: метанол – вода в соотношении 50:50;
- детектирование при длине волны 204 нм;
- температура колонки - комнатная;
- скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин;
- объем вводимой пробы 20 мкл.

Расчет данных производили с использованием программного обеспечения ChemStation.

Идентификацию разделенных веществ проводили путем сопоставления времени удерживания стандартных образцов сесквитерпеновых лактонов с исследуемыми образцами.

Растворы стандартных образцов сесквитерпеновых лактонов готовили по следующей методике: около 0,05 г (т. н.) стандартного образца растворяли в мерной колбе на 25 мл, доводили 70 % этанолом до метки и перемешивали. 0,02 мл раствора вводили в хроматограф.

Относительное содержание отдельных идентифицированных сесквитерпеновых лактонов в исследуемых образцах проводилось методом внутренней нормализации.

Количественное определение сесквитерпеновых лактонов проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ на приборе Shimadzu LC-20 Prominence в изократическом режиме в следующих условиях: аналитическая колонка, заполненная сорбентом PerfectSil 300 ODS C18, 4,6 x 250 мм, с размером частиц 5

мкм; состав подвижной фазы: метанол – вода в соотношении 50:50; детектирование при длине волны 204 нм; температура колонки - комнатная; скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин; объем вводимой пробы 20 мкл [46, 146, 162, 163].

Обработку результатов производили с использованием программного обеспечения LC Solutions. Подробно методика приведена в главе 6.3.

Каротиноиды, хлорофиллы. *Качественное и количественное* определение каротиноидов и хлорофиллов при совместном присутствии проводили спектрофотометрическим методом в ацетоновом извлечении из сырья при длине волны 440,5 нм (каротиноиды), 662,0 нм (хлорофилл А) и 664,0 нм (хлорофилл В). Основой расчета концентрации пигментов служили формулы Веттштейна для ацетонового извлечения [107].

1,0 г (т.н.) растирали в фарфоровой ступке с безводным натрия сульфатом (2,0 г). Измельченный материал экстрагировали ацетоном в соотношении 1:10. Извлечение сливали, фильтруя через бумажный фильтр, в мерную колбу вместимостью 50 мл. Экстракцию повторяли 4 раза до исчезновения окраски извлечения. Далее полученное извлечение доводили до метки ацетоном и измеряли оптическую плотность на спектрофотометре ЮНИКО 2802S при длинах волн 440,5; 662,0 и 664,0 нм.

Расчет вели по следующим формулам:

$$C_{хлА} = 9,78 \times A_{662} - 0,99 \times A_{664}$$

$$C_{хлВ} = 21,42 \times A_{664} - 4,65 \times A_{662}$$

$$C_{хлА+хлВ} = 5,13 \times A_{662} + 20,43 \times A_{664}$$

$$C_{кар} = 4,69 \times A_{440,5} - 0,268 \times C_{хлА+хлВ}, \text{ где}$$

A – оптическая плотность исследуемого извлечения при указанной длине волны.

Содержание пигментов (X) в мг % проводили по следующей формуле:

$$X = \frac{C \times V \times 100}{a \times 1000}, \text{ где}$$

C – концентрация пигмента, в мг/л;

a – масса сырья, в г;

V – объем извлечения, в мл.

Сапонины. Для проведения *качественных реакций* готовили водный настой 1:10, нагревая измельченное сырье на водяной бане в течение 10 минут. Настой после охлаждения фильтровали и проводили качественные реакции [32].

а) Реакция пенообразования: брали две пробирки, в одну наливали 5 мл 0,1 моль/л натрия гидроксида, в другую – 5 мл 0,1 моль/л кислоты хлористоводородной. Затем в обе пробирки добавляли по 2-3 капли извлечения и встряхивали. По образованию в пробирках пены и высоте столба пены делали заключение о наличии и природе сапонинов в сырье. Более высокий столб пены в пробирке с натрия гидроксидом позволяет отнести сапонины к тритерпеновым соединениям. Если более высокий столб пены наблюдается в пробирке с кислотой хлористоводородной, то это свидетельствует о присутствии сапонинов стероидного характера [32].

б) Реакция со свинца ацетатом. К 2 мл настоя прибавляют несколько капель раствора свинца ацетата. Образование белого осадка свидетельствует о наличии сапонинов [32].

в) Реакция Лафона. К 2 мл извлечения добавляли 1 мл концентрированной кислоты серной, 1 мл 96 % спирта этилового, 1 каплю 10 % раствора железа (II) сернокислого. Наличие сине-зеленого окрашивания свидетельствует о наличии сапонинов в сырье [32].

Кардиотонические гликозиды. Для проведения *качественных реакций* готовили извлечение: 5,0 г измельченного сырья заливали 50 мл 80 %-ного спирта этилового, настаивали 24 ч. Спирт отгоняли под вакуумом, водный остаток промывали в делительной воронке четыреххлористым углеродом 6 раз порциями по 10 мл. Сердечные гликозиды извлекали смесью хлороформ – изопропиловый спирт (3:1) 4 раза по 10 мл.

К извлечению добавляли 2 г безводного натрия сульфата, дали постоять 3-5 мин, а затем отфильтровывали через бумажный фильтр, полученный фильтрат использовали для проведения качественных реакций [32, 86]:

а) *Реакция Келлера-Килиани*. Предварительно готовили два раствора:

1 — к 100 мл ледяной кислоты уксусной добавляли 1 мл 5 % раствора железа (III) сульфата;

2 — к 100 мл концентрированной кислоты серной добавляли 1 мл 5 % раствора железа (III) сульфата.

Сухой остаток очищенного извлечения растворяли в растворе 1 и осторожно по стенке пробирки вливали раствор 2. При наличии дезоксисахаров верхний слой через 1-3 мин окрасится в васильково-синий цвет [32, 86].

б) *Реакция Либермана-Бурхардта*. Сухой остаток очищенного извлечения растворяли в 5 мл ледяной кислоте уксусной и добавляли смесь уксусного ангидрида и концентрированной кислоты серной (50:1). Наблюдали появление зеленой окраски [32, 86].

в) *Реакция Розенгейма*. Сухой остаток очищенного извлечения растворяли в хлороформе и смешивали с 90%-ным водным раствором кислоты трихлоруксусной. Наблюдали появление розово-лилового окрашивания [32, 86].

Фенольные соединения. Для проведения *качественных реакций* готовили извлечение по следующей методике: 1,0 г сырья заливали 50 мл 70 % этанола. Нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 минут, процеживали через вату, и полученное извлечение использовали для проведения качественных реакций [10, 25, 32].

а) *Реакция с железа (III) хлоридом*. К 3 мл извлечения добавляли несколько капель 5 % раствора железа (III) хлорида. О наличии в сырье фенольных соединений свидетельствует появление черно-зеленого или черно-синего окрашивания или осадка [22, 32].

б) *Реакция со свинца ацетатом*. К 1 мл извлечения добавляли 2 мл раствора 10 % кислоты уксусной и 1 мл раствора средней соли свинца ацетата. При наличии в сырье фенольных соединений появляется осадок от жёлтого до оранжево-красного цвета [32].

Количественно сумму фенольных соединений определяли методом оксидиметрического титрования раствором калия перманганата (0,02 моль/л). В

качестве индикатора и катализатора реакции использовали 0,001 % раствор индигосульфокислоты [29]. Метод дает представление о содержании всего комплекса окисляемых соединений, переходящих в водное извлечение (танинов, флавоноидов, фенолкарбоновых кислот и др.). Подробно методика описана для определения дубильных веществ.

Фенолокислоты. Для проведения *качественных реакций* готовили извлечение по следующей методике: 0,5 г измельченного сырья помещали в колбу со шлифом вместимостью 50 мл, приливали 25 мл 40 % этилового спирта, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 45 минут с момента закипания спирта в колбе. Колбу с содержимым охлаждали, извлечение перемешивали, фильтровали через бумажный фильтр и использовали для проведения качественного анализа методом хроматографии на бумаге. 0,02 мл спиртового извлечения наносили микрокапилляром на линию старта бумаги марки FN-4 (Filtrak, Германия). Бумагу с нанесенной пробой высушивали на воздухе в течение 5 минут, затем помещали в камеру (предварительное насыщение камеры не менее 1 часа), содержащую 2 % раствор кислоты уксусной и хроматографировали восходящим способом. Когда фронт растворителя дошел до отметки 25-30 см, бумагу вынимали из камеры, высушивали в вытяжном шкафу в течение 10 минут и просматривали в УФ-свете при длине волны 365 нм. Пятна гидроксикоричных кислот имеют голубую, голубовато-зеленую и голубовато-фиолетовую флуоресценцию [5, 50].

Флавоноиды. *Качественное обнаружение флавоноидов* проводили специфическими реакциями.

Для проведения *качественных реакций* готовили извлечение по следующей методике: 1,0 г сырья помещали в широкогорлую колбу, заливали 30 мл 70 % этанола, нагревали на кипящей водяной бане с обратным холодильником 10 мин. Извлечение охлаждали, фильтровали. Так как спиртовое извлечение имело темно-коричневую окраску, которая затрудняла возможность визуального определения результатов *качественных реакций*, то проводили извлечение флавоноидов методом избирательной жидкостной экстракции этилацетатом и бутанолом. Для

этого спиртовое извлечение упаривали до водного остатка на роторном испарителе. Водное извлечение трехкратно экстрагировали в делительной воронке этилацетатом, а затем бутанолом до исчезновения окрашивания. Из объединенных вытяжек удаляли органический растворитель. Полученный сухой остаток растворяли в 70 % этаноле [32]. Данное извлечение использовали для проведения качественных реакций.

а) Проба Синода. В две пробирки с одинаковым количеством извлечения (1 мл) прибавляли по 3 капли концентрированной кислоты хлористоводородной. Затем в одну из пробирок добавляли несколько крупинок металлического цинка, обе пробирки нагревали на водяной бане до кипения и оставляли для охлаждения на 10 минут. О присутствии в извлечении флавоноидов свидетельствует появление оранжево-красного окрашивания [22, 32, 125].

б) Реакции со щелочью. К 0,5 мл полученного извлечения добавляли несколько капель 1 % спиртового раствора щелочи. Флавоны и флавонолы растворяются в щелочах с образованием желтой окраски. Халконы и ауроны сразу же образуют красные или пурпурные растворы (специфичная реакция) [22, 32, 125].

в) Реакция с раствором железа (III) хлорида. К 0,5 мл полученного извлечения добавляли 2 капли 0,5 % раствора железа (III) хлорида. Давать окраску с железом (III) хлоридом – общее свойство полиоксифенольных соединений. Ортооксифенольные группы в молекулах флавоноидов обуславливают зеленую, а триоксифенольные группы – синюю окраску [22, 32, 125].

г) Реакция с алюминия хлоридом. К 1 мл спиртового извлечения добавляли 3-5 капель 5 % спиртового раствора реактива. При наличии флавоноидов появляется желтое окрашивание [32, 125].

Кумарины. Для проведения *качественных реакций* готовили извлечение по следующей методике: 0,5 г измельченного сырья заливали 10 мл 95 % этилового спирта и нагревали на кипящей водяной бане 15 мин. После охлаждения

извлечение фильтровали и в фильтрате проводили качественные реакции [22, 32, 62, 155].

а) *Лактонная проба.* В две пробирки наливали по 1 мл извлечения. В одну из них добавляли 0,5 мл 10 % раствора натрия гидроксида. Обе пробирки нагревали на водяной бане до кипения и охлаждали. В каждую пробирку наливали по 4 мл воды очищенной, перемешивали и прибавляли 1 мл 10 % раствора кислоты хлористоводородной. О присутствии кумаринов судили по возникновению опалесценции, помутнения или образованию осадка.

б) *Реакция образования азокрасителя* (с реактивом Паули). К 1 мл извлечения добавляли 3 мл 1 % спиртового раствора натрия гидроксида и нагревали на водяной бане в течение 5 минут (при наличии кумаринов раствор желтеет). Затем прибавляли 5 капель свежеприготовленного раствора диазотированной кислоты сульфаниловой. При наличии кумаринов появляется вишнево-красное или оранжево-красное окрашивание [22, 32, 62].

в) *Изучение компонентного состава фенольных соединений хроматографическими методами*

Извлечение суммы фенольных соединений проводили 70 % этанолом трехкратной экстракцией из измельченного сырья, проходящего сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, в количестве 100 г (соотношение «сырье/экстрагент» – 1:5 для каждой экстракции) в течение 60 минут с обратным холодильником на водяной бане при температуре 60-70°C. Извлечение фильтровали через бумажный фильтр.

Полученные извлечения объединяли и упаривали под вакуумом на кипящей водяной бане до водного остатка, который оставляли на ночь в холодильнике при температуре 2-6°C. Выпавший осадок липофильных веществ отфильтровывали и промывали водой в количестве 30 мл и объединяли с водным остатком, который последовательно обрабатывали хлороформом, этилацетатом, н-бутанолом в делительной воронке.

Из каждой фракции удаляли растворитель под вакуумом, и полученный сухой остаток измельчали и проводили последовательную обработку

растворителями, используя элюотропный ряд растворителей по Шталю (этилацетат-ацетон-этанол-вода).

Растворитель удаляли, продувая теплым воздухом, полученные сухие остатки использовали для изучения качественного состава фенольных соединений.

Сухие остатки растворяли в 95 % этаноле (3-5 капель) и использовали для анализа методами бумажной хроматографии и хроматографии в тонком слое сорбента. Полученные этанольные растворы каждой фракции в количестве 0,02 мл наносили на линию старта и хроматографировали восходящим способом.

Системы растворителей подбирали с учетом физических и химических свойств определяемых веществ [43, 51, 82, 171, 172], готовили в объемных соотношениях, помещали в камеры и оставляли для насыщения в течение 1-3 часов.

При проведении хроматографии на бумаге использовали бумагу марки FN-4, (Filtrak, Германия) и «ЛМ» Санкт-Петербургской фабрики № 2 имени Володарского (Россия).

Системы растворителей: бутанол – кислота уксусная – вода (БУВ) (4:1:2); 15 % раствор кислоты уксусной; 2 % кислота уксусная; кислота уксусная – кислота хлористоводородная – вода (30:3:10) (система Форесталья) [43, 82, 125, 137, 144].

При проведении хроматографии в тонком слое сорбента использовали пластины «Сорбфил» на полимерной подложке аналитические ПТСХ-П-А/ПТСХ-П-А-УФ и пластины «Сорбфил» на алюминиевой подложке аналитические ПТСХ-АФ-А/ПТСХ-АФ-А-УФ ЗАО Сорбполимер (Россия) размером 10x10.

Системы растворителей: этилацетат–кислота уксусная–вода (5:1:1); хлороформ–этанол (4:1); этилацетат–кислота муравьиная–вода (10:2:3); петролейный эфир–хлороформ (2:1); хлороформ–этанол–вода (100:50:2); хлороформ–метанол (8:2); хлороформ–этанол–этилацетат (8:1:1); этилацетат–кислота муравьиная–кислота уксусная–вода (100:11:11:26).

После прохождения фронта растворителя носитель (бумагу или пластину) высушивали на воздухе, просматривали в УФ-свете при длинах волн 254 и 365 нм до и после проявления и отмечали наличие окрашенных зон.

Детектирование проводили в видимой области и УФ-свете в облучателе хроматографическом УФС-254/365. Проявление пятен осуществляли 10% этанольным раствором калия гидроксида, 5 % этанольным раствором алюминия хлорида, насыщенным раствором калия перманганата, 25 % раствором аммиака (пары).

Для более детального изучения компонентного состава фенольного комплекса сосюреи горькой использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [125, 131, 137, 144, 158] на приборе Shimadzu LC-20 Prominence в изократическом режиме в следующих условиях:

- аналитическая колонка, заполненная сорбентом PerfectSil 300 ODS C18, 4,6 x 250 мм, с размером частиц 5 мкм;
- состав подвижной фазы: ацетонитрил – вода в соотношении 30:70, 50:50 и 70:30;
- детектирование при длине волны 254, 270, 290, 330 и 360 нм;
- температура колонки - комнатная;
- скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин;
- объем вводимой пробы 20 мкл.

Расчет данных производили с использованием программного обеспечения LC Solutions.

Полученные фракции фенольных соединений сосюреи горькой отвешивали по 0,1 г (т.н.) и растворяли в смеси этанол-ацетонитрил (4:1). 0,02 мл раствора вводили в хроматограф.

Идентификацию разделенных веществ проводили путем сопоставления УФ-спектров стандартных образцов фенольных соединений с исследуемыми образцами [88, 125, 131, 137, 144, 154, 155].

В качестве веществ сравнения использовали стандартные вещества производства Sigma-Aldrich, Fluka: кумарины – умбеллиферон: umbelliferone CAS

54826 (Fluka); флавоноиды - лютеолином: luteolin CAS 62696 (Fluka); апигенин: apigenin CAS 10798 (Fluka); космосиин: apigenin 7-glucoside CAS 44692 (Fluka); лютеолин 7-глюкозид: luteolin 7-glucoside CAS 49968 (Fluka); фенолокислоты – феруловая: ferulic acid CAS 46280-F (Fluka); галловая: gallic acid CAS 48630-F (Fluka); кофейная: caffeic acid CAS C0625 (Sigma); хлорогеновая: chlorogenic acid hemihydrate CAS 25700-F (Fluka); сиреневая кислота: syringic acid CAS S6881 (Sigma).

Растворы стандартных образцов фенольных соединений готовили по следующей методике: около 0,05 (т.н.) стандартного образца растворяли в мерной колбе на 25 мл, доводили 70 % этанолом до метки и перемешивали. 0,02 мл раствора вводили в хроматограф.

Относительное содержание отдельных идентифицированных фенольных веществ в исследуемых образцах проводилось методом внутренней нормализации.

Количественный анализ фенолкарбоновых кислот проводили спектрофотометрическим методом без предварительного разделения суммы фенолкарбоновых кислот [50, 58, 108]. Для этого 1,0 г (т.н.) измельченного сырья, проходящего сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, помещали в плоскодонную колбу на 250 мл со шлифом, приливали 100 мл 70 % этанола, присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 1 часа с момента закипания этанола. После охлаждения полученное извлечение фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу на 100 мл и довели 70 % этанолом до метки (раствор А).

1 мл раствора А помещали в мерную колбу на 100 мл и доводили 70 % этанолом до метки (раствор Б).

Спектр полученного раствора Б снимали на спектрофотометре ЮНИКО 2802S при длине волны 330 ± 2 нм в кварцевой кювете с толщиной 1 см. В качестве раствора сравнения использовали 70 % этанол. Параллельно измеряли оптическую плотность раствора ГСО кислоты хлорогеновой. Для этого 2,5 мл раствора стандарта помещали в мерную колбу на 100 мл и доводили 70 %

этанолом до метки. Раствор ГСО кислоты хлорогеновой готовили по следующей методике: около 0,05 г (т.н.) кислоты хлорогеновой растворяли при нагревании в мерной колбе на 100 мл, доводили 70 % этанолом до метки и перемешивали.

Содержание суммы фенолкарбоновых кислот осуществляли в пересчете на кислоту хлорогеновую.

$$X = \frac{A_1 \times a_0 \times 100 \times 2,5 \times 100 \times 100 \times 100}{A_0 \times a_1 \times 1 \times 100 \times 100 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

A_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора ГСО хлорогеновой кислоты;

a_0 – масса ГСО хлорогеновой кислоты, г;

a_1 – масса сырья, г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, %.

Количественно сумму флавоноидов определяли методом дифференциальной спектрофотометрии с использованием реакции образования окрашенных продуктов с алюминия хлоридом [32, 35, 54, 109, 125]. Показания снимали на спектрофотометре ЮНИКО 2802S при длине волны 400 ± 2 нм в кварцевой кювете с толщиной 1 см.

Параллельно определяли оптическую плотность комплекса ГСО лютеолина с алюминия хлоридом. Подробная методика с обоснованием выбора условий экстрагирования, температурного режима, измельченности сырья приведена в главе 6.3

Количественное определение кумаринов [22, 62, 155]. Около 1,0 г (т.н.) сырья измельчали до размера частиц проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 2 мм, и помещали в плоскодонную колбу на 250 мл, приливали 100 мл 95 % этанола и кипятили на водяной бане с обратным холодильником в течение 1 часа. Охлажденное извлечение фильтровали через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл и довели 95 % этанолом до метки (раствор А).

5 мл раствора А помещали в мерную колбу на 100 мл и доводили до метки 95 % этанолом (раствор Б).

Спектр полученного раствора Б снимали на спектрофотометре ЮНИКО 2802S при длине волны 325 ± 2 нм в кварцевой кювете с толщиной 1 см. В качестве раствора сравнения использовали 95 % этанол. Параллельно измеряли оптическую плотность раствора ГСО умбеллиферона. Для этого 1 мл раствора стандарта помещали в мерную колбу на 100 мл и доводили 95 % этанолом до метки. Приготовление ГСО умбеллиферона проводили по следующей методике: около 0,05 г (т.н.) умбеллиферона растворяли в мерной колбе на 100 мл, доводили 95 % этанолом до метки и перемешивали.

Содержание суммы кумаринов (X) в процентах осуществляли в пересчете на умбеллиферон.

$$X = \frac{A_1 \times a_0 \times 100 \times 100 \times 1 \times 100 \times 100}{A_0 \times a_1 \times 5 \times 100 \times 100 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

A_1 – оптическая плотность испытуемого раствора;

A_0 – оптическая плотность раствора ГСО умбеллиферона;

a_0 – масса ГСО умбеллиферона, г;

a_1 – масса сырья, г;

W - потеря в массе при высушивании сырья, %.

Антрагликозиды. Для проведения *качественных реакций* готовили извлечение по следующей методике: 0,5 г измельченного сырья кипятили в течение 5 мин с 10 мл 10 %-ного раствора натрия гидроксида. После охлаждения смесь разбавляли 10 мл воды очищенной и фильтровали. 3 мл фильтрата помещали в пробирку, добавляли 3 мл 10 %-ной кислоты хлористоводородной и 10 мл хлороформа. Осторожно перемешивали и после расслоения жидкости сливали хлороформный слой, фильтруя его через бумажный фильтр. Фильтрат встряхивали с 3 мл 10 %-ного раствора аммиака.

При наличии антрагликозидов наблюдается изменение окраски аммиачного слоя: вишнево-красное (1,8-диоксиантрахиноны), пурпурное (1,4-диоксиантрахиноны) или фиолетовое (1,2-диоксиантрахиноны) окрашивание [32].

Дубильные вещества. Для проведения *качественных реакций* готовили извлечение по следующей методике: 20 г измельченного сырья заливали 100 мл

горячей воды и кипятили в течение 5 минут, процеживали без охлаждения и с фильтратом проводили качественные реакции [32].

а) *Осаждение 1 % раствором желатина.* К 2 мл испытуемого раствора добавляли по каплям 1 % раствор желатина в 10 % растворе натрия хлорида. При наличии дубильных веществ появляется белая муть или осадок, исчезающий при добавлении избытка желатина [22, 32].

б) *Реакция с солями алкалоидов.* К 3-5 мл извлечения добавляли 2-3 капли 1 % раствора соли кодеина. При наличии дубильных веществ наблюдается помутнение раствора [22, 32].

в) *Реакция с квасцами железоммонийными.* К 3 мл извлечения добавляли несколько капель раствора квасцов железоммонийных. Данная реакция позволяет установить преобладание группы гидролизуемых танинов (при появлении черно-синего окрашивания раствора) или группы конденсированных танинов (при появлении черно-зеленого окрашивания и осадка) [22, 32].

За основу *количественного определения дубильных веществ* мы взяли методику, позволяющую выделить из комплекса фенольных соединений дубильные вещества и рассчитать их количественное содержание [1].

Воспроизведение методики условно можно разделить на два этапа. Первый этап определения суммы полифенольных соединений проводили по методике ГФ XI, вып. 1, стр. 286, основанной на титровании раствором калия перманганата (0,02 моль/л), необходимым условием является добавление 0,001 % раствора индигосульфокислоты в качестве индикатора и катализатора реакции.

Второй этап метода заключается в осаждении дубильных веществ раствором желатина и в определении в надосадочной жидкости суммы полифенолов (без дубильных веществ) методом оксидиметрического титрования раствором калия перманганата (0,02 моль/л).

Для этого 100 мл водного извлечения, полученного на предыдущем этапе, помещали в химический стакан, добавляли 5 мл 5 % раствора желатина, отстаивали в течение 3-4 дней при температуре +5°C и фильтровали.

В фильтрате определяли сумму полифенолов аналогично вышеописанной методике. Количественное содержание дубильных веществ рассчитывали по разнице между результатами первого и второго титрования. Параллельно проводили контрольный опыт.

Содержание суммы дубильных веществ, в пересчёте на абсолютно сухое сырьё рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{(V - V_1 - V_2) \times 0,00582 \times 250 \times 100 \times 100}{a \times 25 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

V – объем раствора калия перманганата, израсходованный на титрование контрольного опыта, в мл;

V_1 – объем раствора калия перманганата, израсходованный на титрование на первом этапе, в мл;

V_2 – объем раствора калия перманганата, израсходованный на титрование на втором этапе, в мл;

a – масса сырья, в г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, в %;

0,00582 – количество конденсированных дубильных веществ, соответствующее 1 мл раствора калия перманганата (0,02 моль/л).

Алкалоиды. Для обнаружения алкалоидов 1,0 г измельченного сырья заливали 25 мл 1 % раствора кислоты хлористоводородной и нагревали на кипящей водяной бане 5 минут. Извлечения охлаждали, профильтровывали, с фильтратом проводили реакции с помощью цветных и общесадительных реагентов, таких как реактив Драгендорфа, Фреде, Эрдмана, Марки, Вагнера-Бушарда, Бертрана, Шейблера, раствор пикриновой кислоты [32].

2.5. Методики товароведческого исследования

Для оценки качества сырья общепринятыми фармакопейными методиками определяли основные числовые показатели: измельченность сырья, содержание экстрактивных веществ, влажность, золу общую и нерастворимую в 10% растворе кислоты хлористоводородной, содержание органической и минеральной примеси [28, 29, 30].

2.6. Методики фармакологических исследований

Определение острой токсичности. Экспериментальные исследования и все манипуляции с лабораторными животными выполняли в соответствии с практическими рекомендациями «Этическая экспертиза биомедицинских исследований» [121], с соблюдением правил гуманного обращения с животными [87, 159].

Эксперименты по изучению острой токсичности извлечений при внутрижелудочном введении выполняли на базе Института фармакологии ТНЦ СО РАМН в соответствии с Методическими указаниями по изучению общетоксического действия фармакологических веществ [98].

Острую токсичность образцов в каждой дозе исследовали на 10 беспородных мышах (5 самок и 5 самцов массой 18–22 г) и 10 беспородных крысах (5 самок и 5 самцов массой 250–300 г). Исследуемые образцы водно-спиртовых извлечений вводили в виде суспензий в 1 % крахмальной слизи. Животных наблюдали в течение 14 суток. В течение первых суток наблюдение было постоянным. Для определения показателей острой токсичности (LD_{16} , LD_{50} и LD_{84}) использовали пробит-анализ по методу Литчфилда-Вилкоксона.

Определение противоописторхозной активности. Исследование противоописторхозной активности водно-спиртовых извлечений соссюреи горькой выполняли на базе Института фармакологии ТНЦ СО РАМН и кафедры фармацевтической химии Сибирского государственного медицинского университета (г. Томск) в соответствии с Методическими указаниями по изучению антигельминтной активности фармакологических веществ [98].

Исследование проводили на золотистых хомяках массой 50–60 г месячного возраста (по литературным данным они наиболее восприимчивы к заражению). Животных содержали на обычном пищевом рационе в условиях вивария со свободным доступом к воде и пище.

Рыбу, зараженную метацеркариями *Opisthorchis felineus*, просматривали под микроскопом. Затем мышечную ткань рыбы с кожей и подкожной клетчаткой освобождали от костей и диспергировали до получения однородной массы. Для

модели искусственного переваривания готовили искусственный желудочный сок: на 1 л воды очищенной добавляли 9 г хлорида натрия и 10 мл концентрированной кислоты хлористоводородной, после этого вносили 3,5 г порошкообразного пепсина. Приготовленный таким образом искусственный желудочный сок заливали в колбу на 1 л и вносили 100 г растертой рыбной массы. Далее колбу с содержимым закрепляли на электромагнитную мешалку и помещали в термостат при температуре 37-38°C на 1,5 часа. Далее смесь процеживали, промывали суммарно 1,5-2 кратным объемом физиологического раствора комнатной температуры, постоянно сливая надосадочную жидкость, концентрируя весь осадок вначале в цилиндре объемом 250 мл, затем – 100 мл и, наконец, 30-35 мл. Осадок выливали на часовое стекло диаметром 5 см и под микроскопом наблюдали присутствия метацеркариев.

Затем немедленно производили заражение животных путем введения метацеркариев (не менее 50 метацеркариев на каждого животного) *per os* золотистым хомякам.

Всего в эксперименте использовали 30 золотистых хомяков. Животные были разделены на 3 группы по 10 животных в каждой.

1-й группе вводили водно-спиртовое извлечение соссюреи горькой на 40 % этаноле в дозе 2,2 г/кг, 2-й группе – водно-спиртовое извлечение соссюреи горькой на 70 % этаноле в дозе 2,2 г/кг, 3-й группе – контроль растворителя. В качестве растворителя для всех препаратов использовали 1 % раствор крахмальной слизи.

По литературным данным [98], выделение яиц гельминтов происходит к 20 – 22 суткам после заражения, поэтому схему лечения начинали с 22 дня после введения жизнеспособных метацеркариев в желудок животного.

Введение осуществлялось ежедневно один раз в сутки, внутрижелудочно через зонд в течение 7 дней. Наблюдение за состоянием животных производилось ежедневно.

Через 7 дней после окончания лечения животных декапитировали под эфирным наркозом и производили вскрытие. Из брюшной полости извлекали

печень с желчным пузырем и поджелудочную железу. Путем прокола желчного пузыря выделяли мариты описторхов из пузырной желчи, а из желчных ходов выделение марит осуществляли путем массирования печени. Также путем выдавливания проводили выделение марит из поджелудочной железы.

Наиболее объективный метод учета эффективности дегельминтизации заключается в подсчете отошедших гельминтов, а при последующем вскрытии пролеченных животных, также в подсчете оставшихся паразитов — коэффициент интенс-эффективности (ИЭ), который рассчитывали по формуле:

$$ИЭ = \frac{K-O}{K} \times 100\%, \text{ где}$$

K - среднее число марит описторхов в контрольной группе;

O – среднее число марит описторхов в экспериментальной группе.

В соответствии с методическими указаниями по изучению антигельминтной активности фармакологических веществ [98] при скрининговых исследованиях химических веществ или растительных средств, обладающих антигельминтными свойствами, вещество или препарат считается слабоэффективным при значении показателя интенс-эффективности 50 % и ниже. При эффективности вещества или препарата свыше 50 %, его рекомендуется испытать повторно из-за возможной нестабильности результатов на большем количестве животных и с использованием препарата-стандарта.

Определение гепатопротекторной активности. Фармакологические исследования проводили на 36 крысах-самцах линии Wistar массой 180—200 г. Эксперименты проводили в осенний период, животных содержали в условиях вивария в пластмассовых клетках, при искусственном освещении на стандартной лабораторной диете. Работы в рамках экспериментальных методик выполняли с 10 до 15 ч.

На модели экспериментального токсического гепатита [98] определяли гепатопротекторную активность сухого водно-спиртового извлечения соссюреи

горькой, полученного методом реперколяции с применением 70 % этанола, в дозе 200 мг/кг в пересчете на экстрактивные вещества.

Острый токсический гепатит вызывали у 36 животных подкожным введением 50 % масляного раствора четыреххлористого углерода (CCl_4) из расчета 0,4 мл на 100 г массы крыс ежедневно однократно в течение 4 суток.

Крысы были разделены на 4 группы. 1-й группе вводили водно-спиртовое извлечение сосюреи горькой на 70 % этаноле в дозе 200 мг/кг в форме суспензии в 2 % крахмальной слизи, 2-й группе – препарат сравнения – Легалон® 140 в дозе 100 мг/кг в форме суспензии в 2 % крахмальной слизи, 3-й группе – контроль растворителя (2 % крахмальная слизь), 4-ая группа - интактная. Первое введение производили через сутки после последней инъекции CCl_4 .

Продолжительность фармакотерапии — 7 дней, введение проводили ежедневно однократно, через 1 сутки после последнего введения препаратов крыс декапитировали.

Для оценки выраженности воспалительной реакции на введение CCl_4 после забора проб крови проводили вскрытие животных и изъятие печени. Печень взвешивали и рассчитывали коэффициент масса печени/масса тела в процентах (%).

Состояние экскреторной функции печени исследовали по тесту ретенции бромсульфалеина (БСФ, Sigma CAS № 71-67-0). Для этого животным по легким эфирным наркозом в хвостовую вену вводили раствор БСФ (5 мг/кг), а через 5 мин делали забор крови. Ретенцию БСФ в крови определяли в сыворотке крови спектрофотометрически на длине волны 582 нм после подщелачивания 5 М NaOH. Содержание БСФ в сыворотке крови рассчитывали в процентах от исходного количества (непосредственно после введения БСФ) по предварительно построенному калибровочному графику.

Антитоксическую функцию печени исследовали по результатам гексеналовой пробы. Продолжительность сна у крыс после внутрибрюшинного введения гексенала в дозе 60 мг/кг оценивали по длительности бокового положения.

Для оценки выраженности цитолиза гепатоцитов в сыворотке крови определяли активность аланинаминотрансферазы (АЛАТ) и аспаратаминотрансферазы (АСАТ).

Для этого экспериментальных животных декапитировали под легким эфирным наркозом, кровь сливали в пластиковые пробирки с добавлением стабилизатора – 3,8 % раствора натрия цитрата из расчета 1:9. Затем пробы стабилизированной крови центрифугировали в течение 15 мин (3000 об/мин) на центрифуге СМ-6МТ (ELMI, Латвия). Для получения сыворотки пробы нестабилизированной крови после свертывания центрифугировали в течение 15 мин (5000 об/мин) на центрифуге СМ-6МТ (ELMI, Латвия).

Для оценки синтетической функции печени в сыворотке крови определяли содержание общего холестерина (ОХ) и липопротеидов высокой плотности (ЛПВП), а в плазме крови – фибриногена (ФГ) и общего белка (ОБ). В цельной крови определяли содержание глюкозы.

Уровень глюкозы в цельной крови определяли с помощью глюкометра AccuChek Advantage (Roche Diagnostics GmbH, Швейцария).

Содержание ОХ и ЛПВП, активность ферментов АЛАТ и АСАТ определяли спектрофотометрически с помощью наборов стандартных реактивов CORMAY (PZ CORMAY S.A., Польша) [55].

Концентрацию ФГ в плазме оценивали методом тромбообразования Клаусса с использованием автоматического коагулометра ACL-9000 (Instrumentation Laboratory, США).

Концентрацию ОБ в плазме крови определяли спектрофотометрически с помощью стандартных наборов химических реактивов фирмы «ERBA Lachema» (Чехия) на основе биуретовой реакции при длине волны 660 нм.

Спектрофотометрические исследования биологических объектов проводили на приборах SPECORD 250 (ANALYTIK JENA AG, Германия) и Multiskan Go (Thermo Fisher Scientific, США).

2.7. Валидационная оценка аналитических методик

Важнейшим критерием оценки аналитической методики служит доказательство ее валидности, включающей взаимосвязанную систему характеристик – специфичность, линейность, прецизионность (воспроизводимость) и точность [3, 16, 96, 120, 148, 170].

Специфичность (specificity) — способность однозначно оценивать анализируемое вещество в присутствии других компонентов, которые могут присутствовать в образце [3, 16].

Линейность (linearity) — это способность методики (в пределах диапазона применения) получать результаты испытаний, прямо пропорциональные концентрации анализируемого вещества в образце. Линейность методики определяли по результатам измерения не менее 5 разных разведений исследуемого раствора в диапазоне применения как минимум 80-120 % концентрации анализируемого вещества в исследуемом растворе. Для оценки степени линейности рассчитывали коэффициент корреляции, который должен быть не меньше 0,995 [3, 16, 96, 148].

Прецизионность (precision) аналитической методики выражает степень близости (или степень разброса) результатов для серии измерений, выполненных по данной методике на различных пробах одного и того же однородного образца. Прецизионность может рассматриваться на трех уровнях: сходимость, внутрिलाбораторная прецизионность и воспроизводимость [13, 27, 96, 148].

Воспроизводимость характеризует степень совпадения результатов индивидуальных испытаний при многократном его использовании. Воспроизводимость характеризует надежность анализа в выбранных параметрах метода. Предел воспроизводимости, согласно требованиям нормативной документации, должен находиться в пределах 5 % [13, 27].

Правильность или точность (accuracy, trueness) характеризует степень соответствия между известным истинным значением и значением, полученным по методике [13, 96].

Точность аналитической методики количественного определения подтверждалась на всем диапазоне применения. Оценка проводилась путем сравнения полученного результата с ожидаемым значением.

2.8. Методы статистической обработки результатов исследований

Статистическую обработку полученных результатов проводили путем расчета средней (\bar{X}) и средней квадратичной ошибки (m). О достоверности различий судили, используя параметрический (t-критерий Стьюдента) и непараметрический (Т-критерий Манна-Уитни) методы [16, 30, 65, 104,]. Расчеты проводили с использованием программ STATISTICA 6.0 и SPSS 12.0.

ГЛАВА 3. ХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ СОСЮРЕИ ГОРЬКОЙ

Для решения вопросов использования сосюреи горькой в медицинской практике необходимо детальное исследование её химического состава. Результаты химического исследования в сочетании с данными по фармакологической активности могут быть использованы для научного обоснования подходов к стандартизации сырья. Не менее важной задачей для нас являлось установление возможной взаимосвязи между фармакологической активностью и компонентным составом сосюреи горькой, что позволило бы предложить методологию практического использования травы сосюреи горькой в медицинской практике.

3.1. Качественное обнаружение групп биологически активных веществ

По данным литературных источников биологически активными веществами надземной части сосюреи горькой являются полисахариды, аминокислоты, витамины, фенольные соединения, сесквитерпеновые лактоны, сапонины, растительные пигменты, некоторые авторы отмечают наличие антрагликозидов, кардиотонических гликозидов и алкалоидов (гл. 1.4.).

Полисахариды. В результате проведения качественных реакций были обнаружены полисахариды и инулин, что характерно для семейства сложноцветных.

Для установления количественного содержания в полисахаридном комплексе водорастворимых полисахаридов, пектинов, гемицеллюлоз А и В проводили последовательное фракционное выделение последних.

Кроме того, устанавливали качественный состав полисахаридного комплекса.

Как видно из табл. 4, в полисахаридном комплексе преобладают водорастворимые полисахариды (4,16 %), гемицеллюлоза Б (4,27 %), а также пектиновые вещества (3,54 %). В гораздо меньших количествах представлена гемицеллюлоза А (1,37 %). Качественный состав моносахаридов представлен фруктозой, галактозой, ксилозой, галактуроновой кислотой и глюкозой.

Преобладающим моносахаридом является ксилоза, которая входит в состав каждой фракции полисахаридов.

Таблица 4

Количественное содержание и моносахаридный состав фракций полисахаридов сосюреи горькой

	Количественное содержание	глюкоза	глюкуроновая кислота	галактоза	ксилоза	фруктоза
Полисахаридный комплекс	13,34±0,15	+	+	+	+	+
ВРПС	4,16	+	-	+	+	+
ПВ	3,54	+	+	-	+	-
Гц А	1,37	-	+	-	+	+
Гц В	4,27	+	-	-	+	-

Аминокислоты. В водном извлечении сосюреи горькой были обнаружены α -аминокислоты.

Качественный состав аминокислот сосюреи горькой, проведенный методом ТСХ, показал наличие не менее 7 аминокислот (табл. 5).

Таблица 5

Результаты качественного анализа аминокислот в надземной части сосюреи горькой

Название аминокислоты	Окраска после проявления 0,2 % спиртовым раствором нингидрина	Величина R_f
лизин	сине-фиолетовая	0,05
гистидин	сине-фиолетовая	0,11
аргинин	сине-фиолетовая	0,15
треонин	пурпурная	0,36
валин	сине-фиолетовая	0,45

метионин	сине-фиолетовая	0,50
изолейцин	сине-фиолетовая	0,60

Среди обнаруженных аминокислот особый интерес представляют незаменимые аминокислоты: изолейцин, валин, лизин, метионин, треонин.

Аскорбиновая кислота. В результате хроматографирования водного извлечения в тонком слое сорбента было идентифицировано белое пятно на синем фоне, R_f которого совпадает со стандартным образцом кислоты аскорбиновой.

Эфирное масло. В результате перегонки с водяным паром в приборе Клевенджера 100,0 г надземной части сосюреи горькой обнаружены следы эфирного масла.

Сесквитерпеновые лактоны. Характерной особенностью сесквитерпеновых лактонов является многообразие химической структуры и отсутствие общих свойств, которые можно было бы использовать при их выделении и химической идентификации [22, 99].

В ИК-спектре извлечения, полученного по методу К.С. Рыбалко (рис. 2.), отмечают наличие характеристических полос поглощения в области $1760-1800\text{ см}^{-1}$, характерных для сесквитерпеновых лактонов и отсутствие полос поглощения $1680-1750\text{ см}^{-1}$ и $1600-1620\text{ см}^{-1}$, характерных для ароматических соединений.

Все описанные в настоящее время сесквитерпеновые лактоны содержат γ -лактонный цикл и поэтому имеют в ИК-спектре полосу поглощения лактонного карбонила в области $1740-1800\text{ см}^{-1}$. Однако в области $1740-1750\text{ см}^{-1}$ дают также полосу поглощения карбонилы α -лактона кумаринов, ароматических сложных эфиров и др., но кумарины и ароматические сложные эфиры отличаются еще наличием двух полос в анализируемой области: $1680-1750\text{ см}^{-1}$ ($\text{C}=\text{O}$) и $1600-1620\text{ см}^{-1}$ (ароматическая $\text{C}=\text{C}$). При отсутствии второй полосы в области $1600-1620\text{ см}^{-1}$ полностью исключаются ароматические соединения, что указывает на присутствие γ -лактонов.



Рис. 2. ИК-спектр сесквитерпеновых лактонов сосюреи горькой

Качественный состав сесквитерпеновых лактонов, проведённый методом ТСХ, показал, что на уровне пятна рабочего стандартного образца цинаропикрина, выделенного методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии, появлялось пятно бурого цвета со значением R_f 0,53-0,55. (рис. 3).

Для разработки методики количественного определения необходимо провести детальный анализ компонентного состава сесквитерпеновых лактонов с выявлением доминирующих составляющих. Для решения этой задачи нами был использован метод колоночной хроматографии с последующим анализом полученных фракций методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Метод КХ нами был использован с целью разделения сесквитерпеновых лактонов и очистки от соэкстрактивных веществ, мешающих ВЭЖХ-анализу.

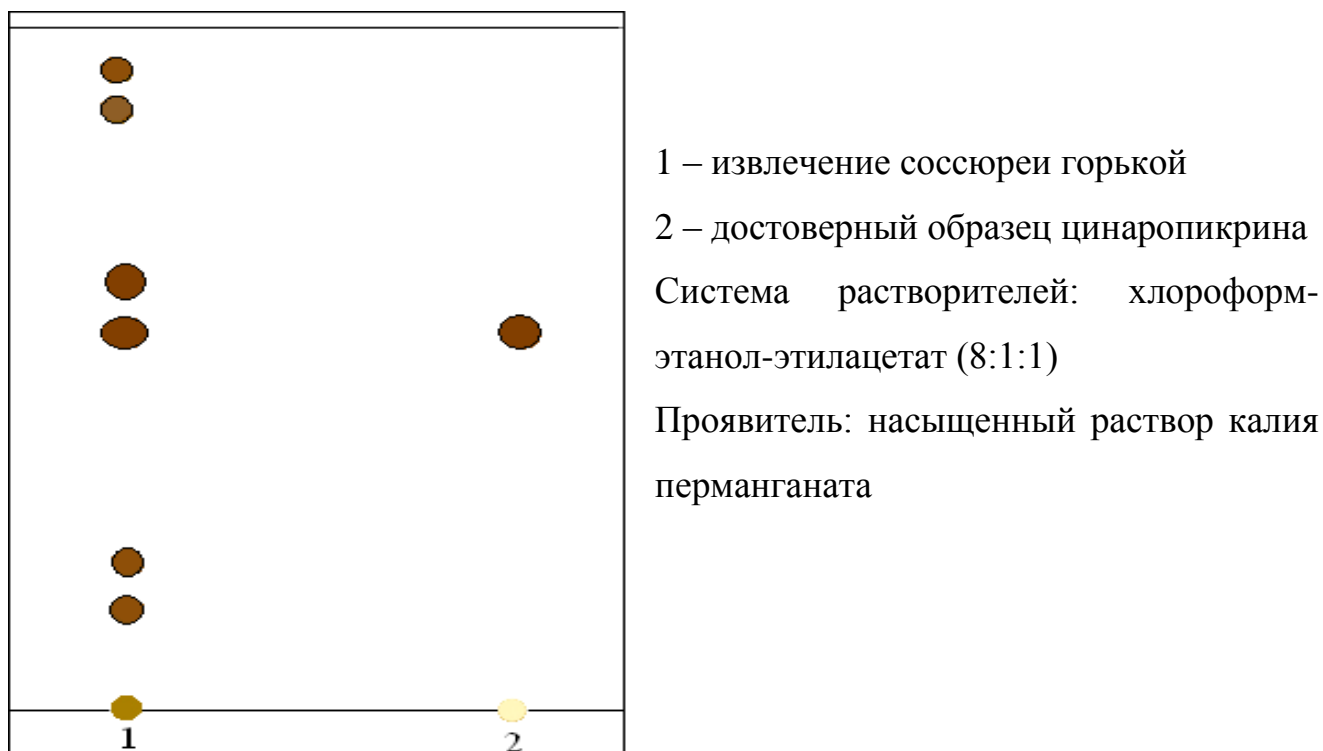


Рис. 3. Хроматограмма сесквитерпеновых лактонов в траве сосюреи горькой

Согласно литературным данным, наиболее подходящим экстрагентом для извлечения сесквитерпеновых лактонов из сырья является смесь хлороформ-этанол (в соотношении 4:1) [89].

С этой целью в стеклянную колонку длиной 50 см, диаметром 3,5 см помещали 75 г силикагеля марки КСК и сверху на подложку из фильтровальной бумаги равномерно распределяли 0,74 г суммы сесквитерпеновых лактонов. Элюентом служила смесь петролейного эфира с этилацетатом в соотношении 1:3. Всего было получено 74 элюата по 20 мл. Контроль над разделением веществ осуществляли с помощью ТСХ на пластинках “Сорбфил” в системе хлороформ-этанол-этилацетат (8:1:1), проявитель – насыщенный раствор калия перманганата. Элюаты с одинаковой хроматографической картиной объединяли. В результате получили 5 объединённых фракций под номерами I(1-10), II(11-28), III(29-49), IV(50-59), V(60-74).

Хроматографический анализ проводили в АО «НПЦ «Фитохимия» (г. Караганда, Республика Казахстан) на жидкостном хроматографе с диодно-матричным УФ-детектором («HEWLETT PACKARD Agilent 1100 Series»).

Количественное содержание идентифицированных сесквитерпеновых лактонов, в процентах, определяли методом сравнения с внешним стандартом. Были использованы следующие стандартные образцы веществ-свидетелей: гроссгемин, репин, цинаропикрин, 15-гидроксиянерин. Полученные данные обобщены в табл. 6.

Таким образом, в результате анализа полученных фракций методом ВЭЖХ нами были идентифицированы следующие сесквитерпеновые лактоны, относящиеся к гваянолидам – гроссгемин, репин и цинаропикрин, из которых доминирующим является цинаропикрин.

Каротиноиды, хлорофиллы. Спектрофотометрирование ацетонового извлечения в видимой области показало наличие трех полос поглощения с $\lambda_{\max}=440$, $\lambda_{\max}=662$ и $\lambda_{\max}=664$ нм, что свидетельствует о присутствии каротиноидов и хлорофиллов.

Сапонины. Присутствие сапонинов в исследуемом сырье доказывали несколькими известными реакциями. Так, в результате реакции пенообразования, водное извлечение при интенсивном встряхивании образовывало незначительное количество пены, быстро исчезающей при стоянии. При добавлении к водному извлечению раствора свинца ацетата наблюдали образование осадка, а в реакции Лафона – сине-зеленое окрашивание.

Таким образом, результаты специфических реакций свидетельствуют о присутствии следов тритерпеновых сапонинов в надземной части сосюреи горькой.

Кардиотонические гликозиды. Присутствие сердечных гликозидов в исследуемом сырье доказывали несколькими известными реакциями. Так, в результате реакций Келлера-Килиани, Либермана-Бурхардта и Розенгейма изменение окраски исследуемого извлечения не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии данной группы соединений.

Фенольные соединения. При проведении общепринятых реакций с растворами солей железа (квасцами железно-аммонийными и железа (III))

хлоридом) наблюдалось интенсивное темно-зеленое окрашивание, свидетельствующее о присутствии фенольных соединений.

Флавоноиды. Цианидиновой пробой, реакцией комплексообразования с растворами алюминия хлорида и железа (III) хлорида было доказано присутствие флавоноидов в надземной части сосюреи горькой.

Фенолокислоты. В результате хроматографирования спиртового извлечения на бумаге обнаружены пятна, имеющие R_f , соответствующие следующим фенолокислотам: хлорогеновой, кофейной и феруловой (табл. 7).

Кумарины. Присутствие кумаринов устанавливали на основе их свойства взаимодействовать с растворами щелочей (лактонная проба), а также образованием азокрасителя.

а) Лактонная проба – о присутствии кумаринов судили по появлению опалесценции.

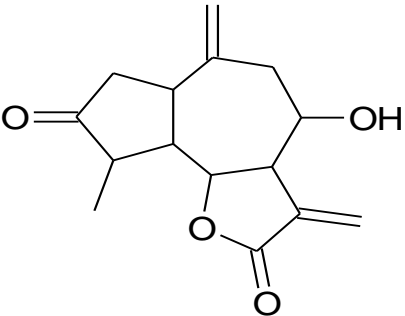
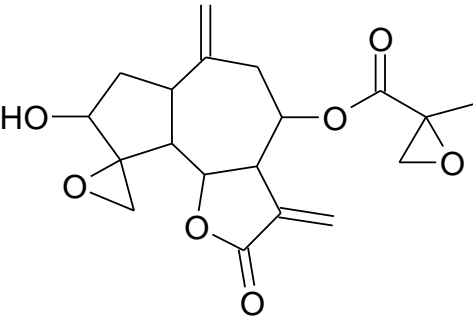
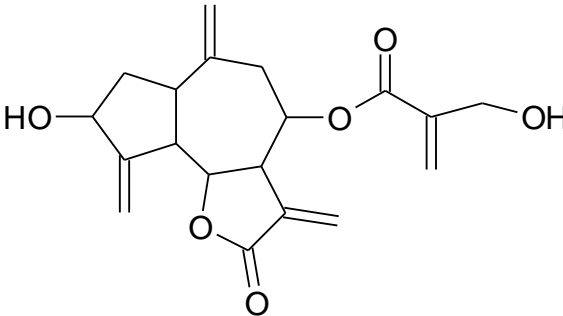
б) Реакция образования азокрасителя – при добавлении к спиртовому извлечению 1% спиртового раствора натрия гидроксида наблюдали желтую окраску, в присутствии диазотированной кислоты сульфаниловой переходящую в оранжево-красную.

Для разработки методики количественного определения необходимо провести детальный анализ компонентного состава фенольных соединений с выявлением доминирующих составляющих. Для решения этой задачи нами был использован хроматографические методы (БХ, ТСХ, ВЭЖХ).

Ввиду значительного количества фенольных соединений (не менее 35 веществ) (рис. 4) нами было проведено поэтапное фракционное разделение фенольных соединений, как указано на рис. 5.

Для предварительного исследования компонентного состава фенольных соединений использовали методы бумажной хроматографии и хроматографии в тонком слое сорбента. Результаты анализа представлены в табл. 7.

Результаты ВЭЖХ-анализа сесквитерпеновых лактонов в надземной части сосюреи горькой

№ объединенной фракции	Гроссгемин	Репин	Цинаропикрин
			
	Содержание во введённой пробе, %		
	Время удерживания, мин $t_R=5,59\pm 0,05$	Время удерживания, мин $t_R=9,28\pm 0,02$	Время удерживания, мин $t_R=11,48\pm 0,07$
1	0,13	0,06	0,17
2	1,80	0,82	3,0
3	1,0	0,12	1,0
4	-	-	0,13
5	-	-	0,05
Итого	2,93	1,0	4,35

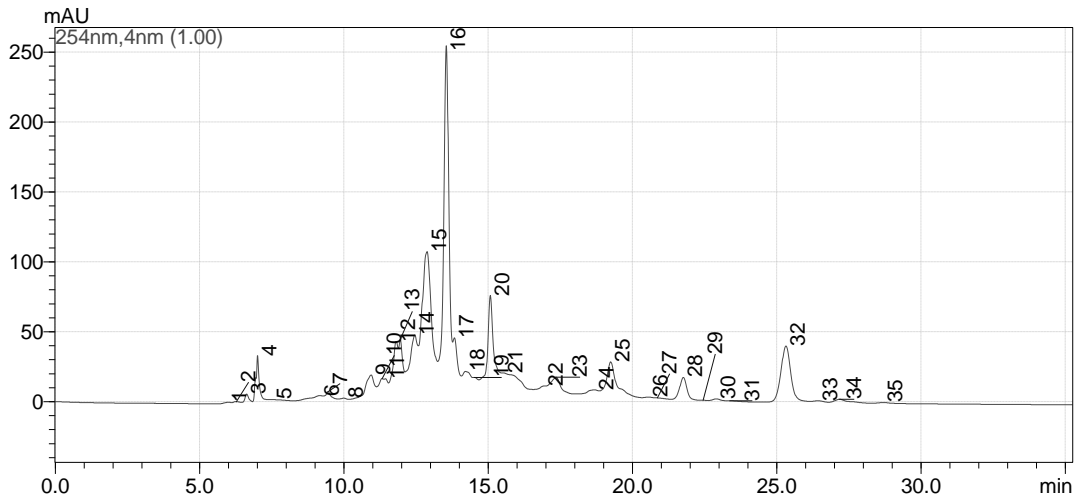


Рис. 4. Хроматограмма 70% этанольного извлечения из сосюреи горькой
По оси абсцисс – время удерживания, мин; по оси ординат – высота пика, mAU.

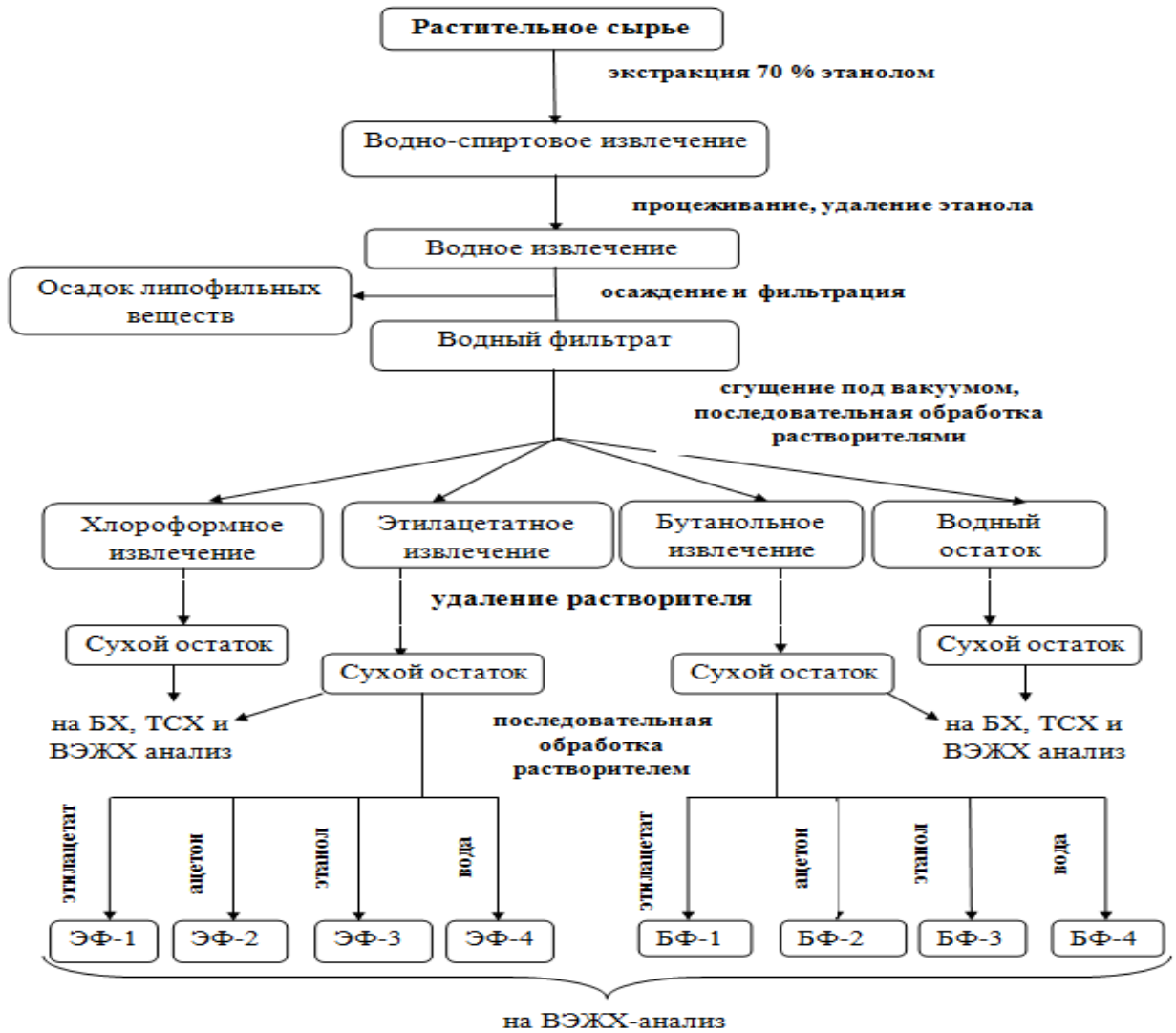


Рис. 5. Схема разделения фенольных соединений в траве сосюреи горькой

Результаты идентификации веществ фенольной природы в надземной части
сосюреи горькой

Название вещества	Окраска в УФ-свете		Величина R _f **
	до проявления	после проявления*	
Хлорогеновая кислота (5-О-кофеил-D-хинная кислота)	голубая	зеленая (пары аммиака)	0,62 I 0,68 II 0,45 V
Цинарин (1,4-дикофеилхинная кислота)	голубая	усиление окраски (пары аммиака)	0,65 V
Кофейная кислота (3,4-диоксикоричная кислота)	голубая	усиление окраски (пары аммиака)	0,82 I 0,48 II 0,9 V
Феруловая кислота (4-окси-3-метоксикоричная кислота)	фиолетово-голубая	фиолетовая (пары аммиака)	0,84 I 0,38 II 0,18 IV
Умбеллиферон (7-гидроксикумарин)	голубая	усиление окраски (спиртовый раствор КОН)	0,32 I
Апигенин (5,7,4'-триоксифлавонон)	бурая	зелено-желтая (спиртовый раствор AlCl ₃)	0,92 I 0,12 II 0,32 IV
Лютеолин (5,7,3',4'-тетрагидрооксифлавонон)	темно-коричневая	желто-зеленая (спиртовый раствор AlCl ₃)	0,85 I 0,10 II
Цинарозид (7-О-β-D-глюкопиранозид лютеолина)	темно-коричневая	желто-коричневая (спиртовый раствор AlCl ₃)	0,57 III 0,69 IV 0,6 V

Примечание * - в скобках указаны реактивы для проявления хроматограмм

** - цифрами обозначены системы растворителей для хроматографирования

I – бутанол–уксусная кислота–вода (4:1:2) – БХ

II – 15 % раствор уксусной кислоты - БХ

III – этилацетат–уксусная кислота–вода (5:1:1) – ТСХ

IV – хлороформ–метанол (8:2) – ТСХ

V – этилацетат–муравьиная кислота–уксусная кислота–вода (100:11:11:26) – ТСХ

Данные таблицы 7 свидетельствуют о достоверном присутствии 8 веществ фенольной природы: кумарины (умбеллиферон), ФКК (хлорогеновая, кофейная, феруловая, цинарин), флавоноиды (апигенин, лютеолин, цинарозид).

Для выявления преобладающих компонентов среди фенольных соединений надземной части сосюреи горькой нами был использован метод ВЭЖХ фракций водно-спиртового извлечения (рис. 5).

В хлороформном извлечении обнаружено 11 веществ фенольной природы, из них идентифицированы кумарины (умбеллиферон), фенолокислоты (галловая кислота, сиреневая кислота), флавоноиды (апигенин) (Приложение № 3, рис. 1).

В ЭФ-1 обнаружены 7 веществ фенольной природы, из них идентифицированы кумарины (умбеллиферон), флавоноиды (апигенин, лютеолин) (Приложение № 3, рис. 2).

В ЭФ-2 обнаружены 7 веществ фенольной природы, из них идентифицированы фенолокислоты (хлорогеновая кислота) флавоноиды (апигенин, лютеолин, лютеолин-7-глюкозид) (Приложение № 3, рис. 3).

В ЭФ-3 обнаружены 19 веществ фенольной природы, из них идентифицированы: флавоноиды (лютеолин-7-глюкозид) (Приложение № 3, рис. 4).

В ЭФ-4 обнаружены 10 веществ фенольной природы, из них идентифицированы: флавоноиды (лютеолин-7-глюкозид) (Приложение № 3, рис. 5).

В БФ-1 обнаружены 10 веществ фенольной природы, из них идентифицированы: фенолокислоты (хлорогеновая кислота, кофейная кислота) флавоноиды (апигенин, космосиин, лютеолин-7-глюкозид) (Приложение № 3, рис. 6).

В БФ-2 обнаружены 8 веществ фенольной природы, из них идентифицированы: флавоноиды (апигенин, космосиин, лютеолин-7-глюкозид) (Приложение № 3, рис. 7).

В БФ-3 обнаружены 10 веществ фенольной природы, из них идентифицированы: флавоноиды (гликозид апигенина, гликозид лютеолина) (Приложение № 3, рис. 8).

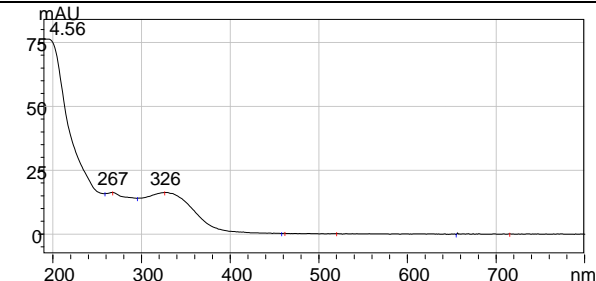
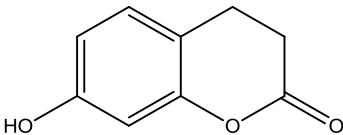
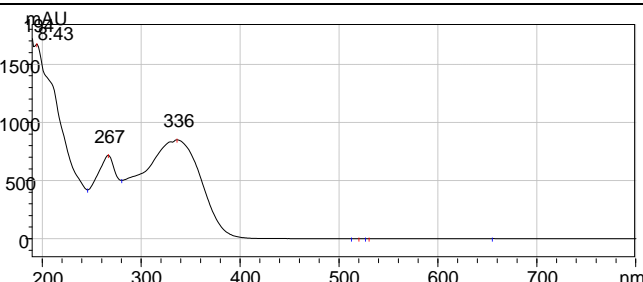
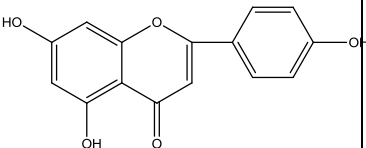
В БФ-4 обнаружены 11 веществ фенольной природы, из них идентифицированы: фенолокислоты (феруловая, хлорогеновая, галловая кислоты), флавоноиды (лютеолин, космосиин) (Приложение № 3, рис. 9).

В водном остатке обнаружены 9 веществ фенольной природы, из них идентифицированы: фенолокислоты (сиреневая кислота), флавоноиды (апигенин, космосин) (Приложение № 3, рис. 10).

Таким образом, в результате ВЭЖХ - анализа фракций нами была получена дополнительная информация о компонентном составе фенольных соединений, содержащихся в надземной части сосюреи горькой. Полученные данные представлены в табл. 8.

Таблица 8

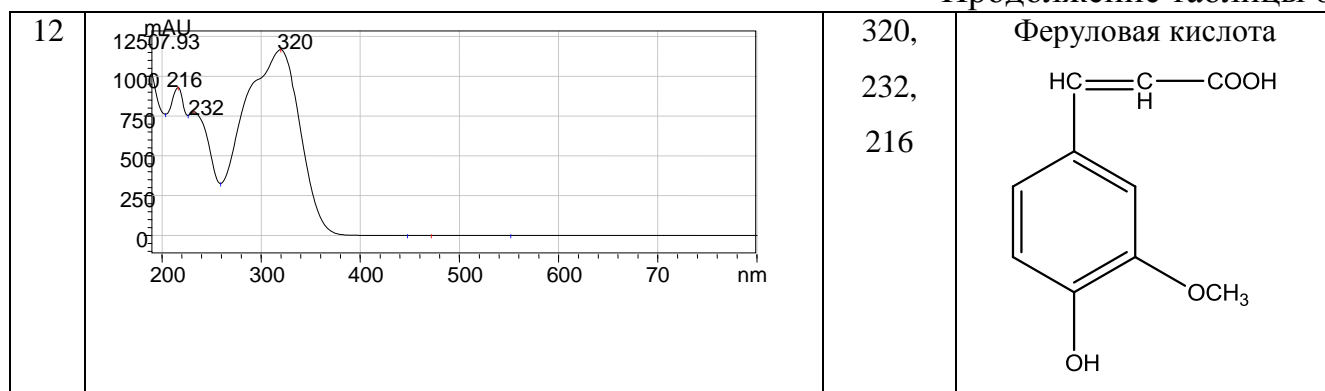
Результаты ВЭЖХ-анализ фенольных соединений надземной части сосюреи горькой

№ п/п	УФ-спектр выделенных веществ	λ_{\max} , нм	Идентифицировано
1	2	3	4
кумарины			
1		325, 267	Умбеллиферон 
Флавоноиды			
2		336, 267	Апигенин 

Продолжение таблицы 8

3		339, 263	<p>Космосин</p>
4		334, 267	<p>Гликозид апигенина</p> <p>где R—неустановленный сахарный остаток</p>
5		349, 262, 251	<p>Лютеолин</p>
6		346, 267, 251	<p>Гликозид лютеолина</p> <p>где R—неустановленный сахарный остаток</p>
7		348, 267, 253	<p>Лютеолин-7-гликозид</p>

фенолокислоты			
8	<p>UV-Vis spectrum of Siroisic acid. The y-axis is mAU (0 to 30) and the x-axis is nm (200 to 700). The spectrum shows a peak at 219 nm and a smaller peak at 267 nm.</p>	267, 219	<p>Сиреневая кислота</p> <p><chem>COc1cc(C(=O)O)c(O)c(OC)c1</chem></p>
9	<p>UV-Vis spectrum of Gallic acid. The y-axis is mAU (0 to 100) and the x-axis is nm (200 to 700). The spectrum shows a peak at 219 nm and a smaller peak at 264 nm.</p>	264, 218	<p>Галловая кислота</p> <p><chem>Oc1cc(C(=O)O)c(O)c(O)c1O</chem></p>
10	<p>UV-Vis spectrum of Caffeoyl acid. The y-axis is mAU (0 to 50) and the x-axis is nm (200 to 700). The spectrum shows peaks at 217 nm, 233 nm, and 324 nm.</p>	324, 233, 217	<p>Кофейная кислота</p> <p><chem>Oc1cc(O)cc(C=Cc2cc(O)c(O)cc2)c1</chem></p>
11	<p>UV-Vis spectrum of Chlorogenic acid. The y-axis is mAU (0 to 50) and the x-axis is nm (200 to 700). The spectrum shows peaks at 217 nm, 241 nm, and 326 nm.</p>	326, 241, 217	<p>Хлорогеновая кислота</p> <p><chem>Oc1cc(O)c(O)cc(OC(=O)C=Cc2cc(O)c(O)c(O)c2)c1</chem></p>



На основании данных хроматографического анализа можно сделать вывод о доминирующем присутствии следующих веществ: кумарины (умбеллиферон), фенолкарбоновые кислоты (хлорогеновая кислота), флавоноиды (лютеолин и его гликозиды).

Антрагликозиды. Для качественного обнаружения антрагликозидов проводили фармакопейную реакцию, основанную на взаимодействии антраценпроизводных с растворами щелочей с образованием окрашенных соединений. При проведении реакции изменение окраски аммиачного слоя не наблюдалось, что свидетельствует об отсутствии данной группы соединений в исследуемом объекте.

Дубильные вещества. Результаты качественных реакций свидетельствуют о присутствии данной группы веществ в надземной части сосюреи горькой (образование осадка с раствором свинца ацетата, образование быстроисчезающего осадка при добавлении раствора желатина). При добавлении раствора солей железа (III) наблюдали появление черно-зеленого окрашивания, что позволяет сделать вывод о преобладающем присутствии конденсированных дубильных веществ. Быстрое исчезновение осадка при добавлении раствора желатина свидетельствует о незначительном содержании дубильных веществ в надземной части сосюреи горькой.

Алкалоиды. Для обнаружения алкалоидов в траве сосюреи горькой использовали известные реакции с цветными и общеосадительными реактивами. В результате при добавлении к исследуемому извлечению кислот

кремневольфрамовой, фосфорномолибденовой, фосфорновольфрамовой, пикриновой, реактивов Вагнера-Бушарда, Майера, Эрдмана, Фреде, Марки и Драгендорфа появление осадка (помутнения) или окрашивания не наблюдали, что свидетельствует об отсутствии указанного класса соединений в исследуемом объекте.

Различными химическими и физико-химическими методами было проведено изучение БАВ сосюреи горькой. Установлено присутствие 12 групп БАВ, в том числе полисахариды, в основном, представлены водорастворимым комплексом и гемицеллюлозой В; аминокислоты (лизин, гистидин, аргинин, треонин, валин, метионин, изолейцин); каротиноиды, хлорофиллы, аскорбиновая кислота; эфирное масло (следы); сесквитерпеновые лактоны – гваянолиды: цинаропикрин, гроссгемин и репин; сапонины (следы); в составе фенольных соединений обнаружены: кумарины (умбеллиферон), флавоны и их гликозиды (апигенин, космосиин, лютеолин, цинарозид), фенолкарбоновые кислоты и их производные (кислоты хлорогеновая, кофейная, галловая, феруловая, сиреневая и цинарин), дубильные вещества; не обнаружены алкалоиды, антрагликозиды и кардиотонические гликозиды.

На следующем этапе исследования нами было проведено определение количественного содержания всех вышеперечисленных групп, кроме сапонинов и эфирного масла.

3.2. Количественное определение БАВ

Опираясь на ранее проведенные исследования качественного состава, было проведено количественное определение групп БАВ с целью выделения преобладающих групп БАВ для дальнейшего научного обоснования возможного фармакологического эффекта и разработки методик стандартизации.

Полисахариды. Содержание суммы полисахаридов в надземной части сосюреи горькой, установленное гравиметрическим методом, составляет $13,34 \pm 0,15$ % (табл. 9).

Таблица 9

Метрологическая характеристика методики количественного определения
полисахаридов в соснуре горькой

n	X_{cp}	S^2	S	S_r	t (0,95,f=9)	$X_{cp} \pm \Delta x$
10	13,34	2×10^{-3}	$4,47 \times 10^{-2}$	$3,4 \times 10^{-3}$	2,26	$13,34 \pm 0,15$

Аминокислоты. Результаты анализа образцов соснуре показали, что содержание аминокислот в исследуемом сырье составляет $0,480 \pm 0,009$ % (табл. 10).

Таблица 10

Метрологическая характеристика методики количественного определения
аминокислот в соснуре горькой

n	X_{cp}	S^2	S	S_r	t (0,95,f=9)	$X_{cp} \pm \Delta x$
10	0,480	$0,55 \times 10^{-3}$	$7,42 \times 10^{-3}$	$15,39 \times 10^{-3}$	2,26	$0,480 \pm 0,009$

Аскорбиновая кислота. В результате исследований установили, что содержание аскорбиновой кислоты в надземной части соснуре горькой составляет $0,124 \pm 0,005$ % (табл. 11).

Таблица 11

Метрологическая характеристика методики количественного определения
аскорбиновой кислоты в соснуре горькой.

n	X_{cp}	S^2	S	S_r	t (0,95,f=9)	$X_{cp} \pm \Delta x$
10	0,124	$2,8 \times 10^{-3}$	$5,8 \times 10^{-3}$	$4,68 \times 10^{-2}$	2,26	$0,124 \pm 0,005$

Сесквитерпеновые лактоны. По результатам количественного определения сесквитерпеновых лактонов методом обращенно-фазовой ВЭЖХ было установлено, что содержание сесквитерпеновых лактонов в пересчете на цинаропикрин в надземной части соснуре горькой составляет $0,608 \pm 0,024$ % (табл. 12).

Таблица 12

Метрологическая характеристика методики количественного определения
сесквитерпеновых лактонов в соснуре горькой

n	X_{cp}	S^2	S	S_r	t (0,95)	$X_{cp} \pm \Delta x$
10	0,608	$0,55 \times 10^{-4}$	$6,7 \times 10^{-3}$	$1,1 \times 10^{-2}$	2,26	$0,608 \pm 0,024$

Каротиноиды, хлорофиллы. Проведённые исследования установили, что в надземной части сосюреи горькой содержание хлорофилла А составляет $15,8 \pm 0,7$ мг%, хлорофилла В – $29,3 \pm 0,6$ мг%, а каротиноидов – $1,6 \pm 0,19$ мг% (табл. 13).

Таблица 13

Метрологическая характеристика методики количественного определения каротиноидов и хлорофиллов в сосюрее горькой

БАВ	n	X_{cp}	S^2	S	S_r	t (0,95, f=9)	$X_{cp} \pm \Delta x$
Каротиноиды	10	1,6	$3,6 \times 10^{-3}$	0,06	$3,84 \times 10^{-2}$	2,26	$1,6 \pm 0,19$
Хлорофилл А	10	15,8	$4,69 \times 10^{-2}$	0,2165	$1,37 \times 10^{-2}$		$15,8 \pm 0,7$
Хлорофилл В	10	29,3	$3,17 \times 10^{-2}$	0,178	$6,1 \times 10^{-3}$		$29,3 \pm 0,6$

Фенольные соединения. Определение содержания суммы фенольных соединений показало, что их количество в надземной части сосюреи горькой составляет $8,56 \pm 0,05$ % (табл. 14).

Таблица 14

Метрологическая характеристика методики количественного определения фенольных соединений в сосюрее горькой

n	X_{cp}	S^2	S	S_r	t (0,95)	$X_{cp} \pm \Delta x$
10	8,56	$1,3 \times 10^{-3}$	$3,61 \times 10^{-2}$	$6,7 \times 10^{-3}$	2,26	$8,56 \pm 0,05$

Фенолокислоты. При исследовании УФ-спектра поглощения 70 % спиртового извлечения из надземной части сосюреи горькой установлено, что при длине волны 325 ± 2 нм наблюдается выраженный максимум. Аналогичный максимум поглощения имеет 0,001 % раствор кислоты хлорогеновой (рис. 6).

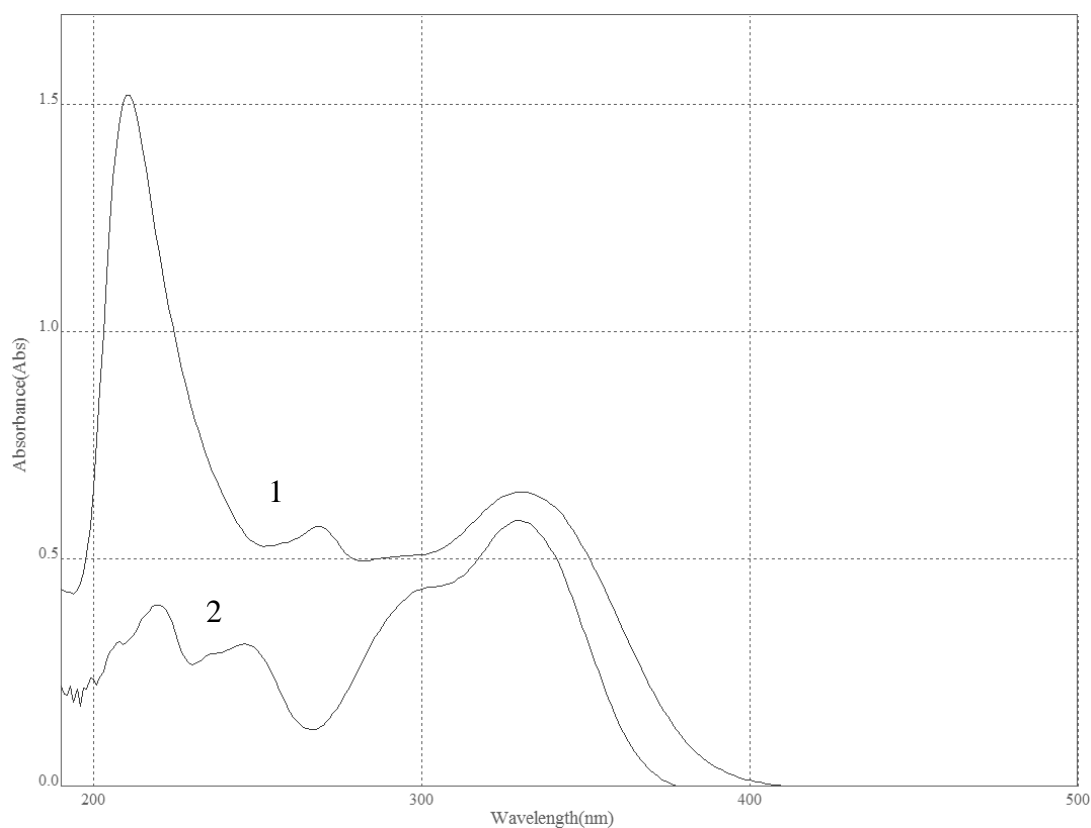


Рис. 6. Спектр в УФ и видимой области спиртового извлечения сосюреи горькой (1) и стандартного образца кислоты хлорогеновой (2)

По оси абсцисс – длина волны, нм; по оси ординат – оптическая плотность.

Таким образом, предложено использовать в качестве аналитической длину волны 330 нм и проводить количественное определение суммы фенолкарбоновых кислот в пересчете на кислоту хлорогеновую.

Количественный анализ проводили спектрофотометрическим методом без предварительного разделения суммы фенолкарбоновых кислот.

Результаты количественного определения показали, что содержание фенолкарбоновых кислот в пересчете на кислоту хлорогеновую в надземной части сосюреи горькой составляет $4,45 \pm 0,16$ % (табл. 15).

Таблица 15

Метрологическая характеристика методики количественного определения фенолкарбоновых кислот в сосюрее горькой

n	X_{cp}	S^2	S	S_r	t (0,95)	$X_{\text{cp}} \pm \Delta x$
10	4,45	$2,5 \times 10^{-3}$	$4,99 \times 10^{-2}$	$1,12 \times 10^{-2}$	2,26	$4,45 \pm 0,16$

Флавоноиды. Результаты анализа образцов сосюреи показали, что содержание флавоноидов в исследуемом сырье составляет $2,74 \pm 0,034$ % (табл. 16).

Таблица 16

Метрологическая характеристика методики количественного определения флавоноидов в сосюрее горькой

n	X_{cp}	S^2	S	S_r	t (0,95,f=7)	$X_{cp} \pm \Delta x$
8	2,74	$1,0 \times 10^{-4}$	$1,13 \times 10^{-2}$	$4,1 \times 10^{-3}$	2,36	$2,74 \pm 0,034$

Кумарины. Исследование УФ-спектра поглощения 95 % этанольного извлечения из надземной части сосюреи горькой показало, что при длине волны 325 ± 2 нм наблюдается выраженный максимум. Аналогичный максимум поглощения имеет 0,001 % раствор умбеллиферона (рис. 7).

Таким образом, предложено использовать в качестве аналитической длину волны 325 нм и проводить количественное определение суммы кумаринов в пересчете на умбеллиферон.

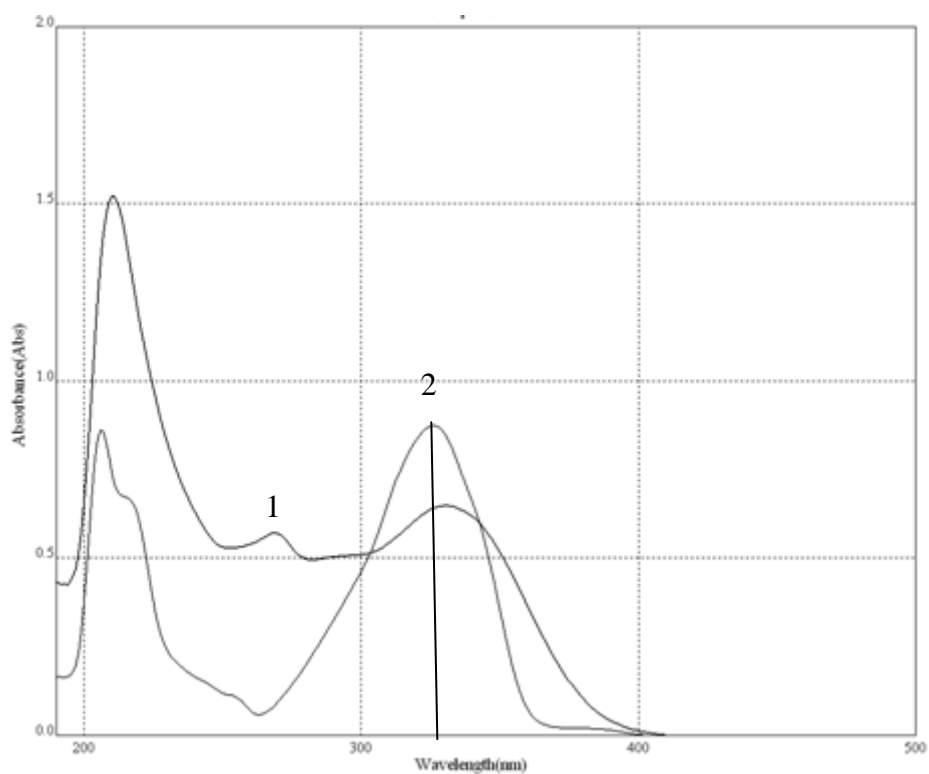


Рис. 7. УФ-спектр 95% этанольного извлечения сосюреи горькой (1) и стандартного образца умбеллиферона (2)

По оси абсцисс – длина волны, нм; по оси ординат – оптическая плотность.

Количественный анализ суммы кумаринов проводили спектрофотометрическим методом без предварительного разделения при длине волны равной 325 нм.

Результаты количественного определения показали, что содержание кумаринов в пересчете на умбеллиферон в надземной части сосюреи горькой составляет $0,598 \pm 0,021$ % (табл. 17).

Таблица 17

Метрологическая характеристика методики количественного определения кумаринов в сосюрее горькой

n	X_{cp}	S^2	S	S_r	t (0,95)	$X_{cp} \pm \Delta x$
10	0,598	1×10^{-4}	$7,5 \times 10^{-3}$	$1,25 \times 10^{-2}$	2,26	$0,598 \pm 0,021$

Дубильные вещества. Результаты анализа образцов сосюреи показали, что содержание дубильных веществ в исследуемом сырье составляет $0,501 \pm 0,018$ % (табл. 18).

Таблица 18

Метрологическая характеристика методики количественного определения дубильных веществ в сосюрее горькой

n	X_{cp}	S^2	S	S_r	t (0,95, f=9)	$X_{cp} \pm \Delta x$
10	0,501	$2,0 \times 10^{-4}$	$1,53 \times 10^{-2}$	$3,05 \times 10^{-2}$	2,36	$0,501 \pm 0,018$

Итоговые результаты количественного анализа групп биологически активных веществ в надземной части сосюреи горькой представлены в таблице 19.

Таблица 19

Результаты фитохимического анализа надземной части сосюреи горькой

($X \pm m$, X – среднее значение, m – доверительный интервал, $n=10$)

Группа БАВ	Содержание, %
Полисахариды:	13,34±0,15
Аминокислоты	0,48±0,01
Аскорбиновая кислота	0,12±0,01
Сесквитерпеновые лактоны	0,61±0,02
Каротиноиды (мг%)	1,60±0,19
Хлорофилл А (мг%)	15,80±0,70
Хлорофилл В (мг%)	29,30±0,60
Фенольные соединения	8,56±0,12
из них:	
фенолкарбоновые кислоты	4,45±0,16
флавоноиды	2,74±0,03
кумарины	0,59±0,02
дубильные вещества	0,50±0,02

Обобщая результаты фитохимического исследования сосюреи горькой, следует отметить, что доминирующими компонентами из групп БАВ, с точки зрения количественного содержания, являются полисахариды и фенольные соединения, также необходимо отметить сесквитерпеновые лактоны.

Значимость выбранных нами групп БАВ подтверждается многочисленными данными литературы, которые свидетельствуют о том, что фенольный комплекс, сесквитерпеновые лактоны и полисахариды являются важными компонентами суммарных комплексов растений и обладают широким спектром биологической активности. Они могут обуславливать антиоксидантное, противовоспалительное, противопаразитарное, Р-витаминное, гепатопротекторное, противоопухолевое, желчегонное, антимикробное и другие виды действий [23, 33, 78, 119, 137, 144].

Учитывая разнообразный химический состав, следующим этапом нашего исследования была оценка фармакологических свойств надземной части сосюреи горькой.

ГЛАВА 4 ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИЗВЛЕЧЕНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ НАДЗЕМНОЙ ЧАСТИ СОССЮРЕИ ГОРЬКОЙ

Внедрение в медицинскую практику нового лекарственного растительного сырья невозможно без предварительной оценки его безопасности. С этой целью нами проведено экспериментальное исследование острой токсичности водно-спиртовых извлечений соссюреи горькой, полученных методом лабораторным методом реперколяции на 40 и 70 % этаноле.

4.1. Исследование острой токсичности водно-спиртовых извлечений соссюреи горькой

Изучение острой токсичности водно-спиртового извлечения соссюреи горькой на 40% этаноле. *Исследование на мышах.* Внутрижелудочное введение водно-спиртовых извлечений соссюреи горькой на 40% этаноле в дозе 50,0 г/кг вызывало гибель всех животных обеих групп (самок и самцов) в течение первых суток после введения. При внутрижелудочном введении водно-спиртовых извлечений соссюреи горькой на 40% этаноле в дозах 35,0 г/кг и 30,0 г/кг отмечалась гибель самцов в количестве 4 и 1 соответственно и самок в количестве 5 и 2 соответственно, в течение двух суток. В дозе 25,0 г/кг смертности животных в обеих группах не наблюдалось.

Таким образом, при внутрижелудочном введении водно-спиртовых извлечений соссюреи горькой на 40% этаноле значения показателей острой токсичности составили: $LD_{16} - 29,32 \pm 3,02$ г/кг, $LD_{50} - 33,37 \pm 2,69$ г/кг и $LD_{84} - 42,30 \pm 5,64$ г/кг у самцов; $LD_{16} - 26,57 \pm 1,99$ г/кг, $LD_{50} - 30,26 \pm 1,54$ г/кг и $LD_{84} - 34,45 \pm 2,60$ г/кг у самок.

Исследование на крысах. Внутрижелудочное введение водно-спиртовых извлечений соссюреи горькой на 40% этаноле в дозе 5,0 г/кг не вызывало гибели животных в обеих группах (самцов и самок).

Изучение острой токсичности водно-спиртового извлечения соссюреи горькой на 70% этаноле. *Исследование на мышах.* Внутрижелудочное введение водно-спиртовых извлечений соссюреи горькой на 70% этаноле в дозе 35,0 г/кг

вызывало гибель всех животных обеих групп (самцов и самок) в течение первых суток после введения. При внутрижелудочном введении водно-спиртовых извлечений соссуреи горькой на 70% этаноле в дозе 25,0 г/кг отмечалась гибель самцов и самок в количестве 3 и 1 соответственно в течение двух суток. В дозе 13,0 г/кг смертности животных в обеих группах не наблюдалось.

Таким образом, при внутрижелудочном введении водно-спиртовых извлечений соссуреи горькой на 70% этаноле значения показателей острой токсичности составили: LD₁₆ – 14,90±3,62 г/кг, LD₅₀ – 21,95±3,40 г/кг и LD₈₄ – 32,33±6,58 г/кг у самцов; LD₁₆ – 24,4±2,64 г/кг, LD₅₀ – 28,54±2,21 г/кг и LD₈₄ – 33,39±3,51 г/кг у самок.

Исследование на крысах. Внутрижелудочное введение водно-спиртовых извлечений соссуреи горькой на 70% этаноле в дозе 5,0 г/кг не вызывало гибели животных в обеих группах (самцов и самок).

Токсический эффект больших доз водно-спиртовых извлечений соссуреи горькой проявлялся у животных спустя 1,5–3 ч после введения, отравление развивалось остро с нарушениями дыхания и судорогами всех мышц туловища. Смерть наступала через 5–8 часов после введения водно-спиртового извлечения. Основной причиной гибели являлась остановка дыхания. Макроскопическое исследование жизненно важных органов свидетельствует, что гибель животных при введении токсических доз водно-спиртового извлечения соссуреи горькой обусловлена гемодинамическими изменениями в сердце, легких и мозге. Вероятной причиной смерти является острая сердечная недостаточность.

При введении субтоксических доз водно-спиртовых извлечений отмечались выраженные изменения со стороны функциональных показателей экспериментальных животных: угнетение поведенческих реакций (выраженное снижение двигательной активности, возбудимости, реактивности и агрессивности), расстройства походки, снижение реакции на прикосновение и болевое раздражение, снижение силы схватки.

В результате исследований острой токсичности водно-спиртовых извлечений соссуреи горькой на 40% и 70% этаноле, полученных методом

реперколяции, выявлено, что образцы водно-спиртовых извлечений в соответствии с ГОСТ 12.1007-76 относятся к IV классу опасности – «вещества малоопасные» [26].

Следующим этапом нашего исследования была оценка специфической активности извлечений из сосюреи горькой.

4.2 Исследование специфической активности водно-спиртовых извлечений сосюреи горькой

Для обоснования использования сосюреи горькой в медицинской практике нами была проведена оценка её фармакологических свойств. При выборе фармакологических тестов руководствовались сведениями научной литературы и результатами проведенных фитохимических исследований.

Исследование противоописторхозной активности водно-спиртовых извлечений сосюреи горькой. В результате фитохимического исследования надземной части сосюреи горькой нами были обнаружены сесквитерпеновые лактоны, которые, согласно исследованиям ряда авторов [22, 99, 151, 161], играют ведущую роль в антигельминтной активности растительных препаратов.

Среди биогельминтозов особое место занимает описторхоз, являясь самым распространенным гельминтозом, основной очаг которого приходится на Обь-Иртышский бассейн и, учитывая также его социальную значимость [12, 31], нами было проведено скрининговое исследование противоописторхозной активности водно-спиртовых извлечений сосюреи горькой. Результаты представлены в табл. 20.

Таблица 20

Количество марит описторхов, выделенных из органов гепатобилиарной системы
золотистых хомячков

($X \pm m$, X – среднее значение, m – доверительный интервал, $n=10$)

Экспериментальные группы	Среднее число марит описторхов, шт.	Показатель интенс-эффективности, %
1-я группа (извлечение на 70 %-м этаноле)	13±1	62,85±4,65 ^{*#}

2-я группа (извлечение на 40 %-м этаноле)	21±2	30,11±8,85*
3 группа (контроль растворителя)	31±1	–

Примечание: * - $p < 0,05$ по сравнению с контролем, # - $p < 0,05$ по сравнению с группой № 2

Полученные данные достоверно указывают на количественное снижение марит описторхов, что является характеристикой изучаемого фармакологического действия.

В результате исследования противоописторхозной активности было установлено, что средняя приживаемость описторхов в печени подопытных животных составила 69 %. Введение водно-спиртовых извлечений соссюреи горькой на 70 и 40 %-м этаноле приводило к дегельминтизации золотистых хомячков в разной степени: коэффициент ИЭ в 1-й группе, где животные получали водно-спиртовое извлечение соссюреи на 70 %-м этаноле, составил $62,85 \pm 4,65$ %, а во 2-й группе, где животные получали водно-спиртовое извлечение соссюреи на 40 %-м этаноле – $30,11 \pm 8,85$ %.

Выявлено, что противоописторхозной активностью обладает 70 % водно-спиртовое извлечение соссюреи горькой (ИЭ составляет 63 %). При этом необходимо отметить что, противоописторхозная активность 40 % спиртового водно-спиртового извлечения, является слабоэффективной (ИЭ составляет 30 %) [98].

Исследование гепатопротекторной активности водно-спиртовых извлечений соссюреи горькой. Проведенная выше оценка противоописторхозных свойств выявила перспективность внедрения соссюреи горькой в качестве источника противоописторхозного растительного средства. Актуальность полученных данных объясняется еще и тем фактом, что для лечения данной патологии используются препараты синтетического происхождения, обладающие рядом побочных действий, одним из которых является нарушение функциональной активности печени [68, 79]. Фитохимический анализ надземной части соссюреи

горькой выявил значительное содержание флавоноидов, которые обладают широким спектром биологической активности, в том числе и гепатопротекторным эффектом [33, 78, 119]. Следовательно, оценка возможного гепатопротекторного действия водно-спиртовых извлечений сосюреи горькой предоставляет собой несомненный практический интерес.

Для оценки гепатопротекторной активности использовали водно-спиртовое извлечение сосюреи горькой на 70 % спирте этиловом. Результаты эксперимента представлены в таблице 21.

Нами установлено, что интоксикация тетрахлорметаном (CCl_4) экспериментальных животных вызвала нарушение всех основных функций печени (антитоксической, синтетической и экскреторной). Увеличение продолжительности гексобарибиталового сна на 50 % по сравнению с группой интактных животных свидетельствует о нарушении антитоксической функции печени экспериментальных животных. Повышение ретенции БСФ в 2,3 раза указывает на нарушение антитоксической и экскреторной функции печени контрольной группы животных. На расстройство синтетической функции печени указывает снижение содержания ЛПВП, ОХ в сыворотке крови и ОБ в плазме на 17 %, 13 % и 16 % соответственно, содержание фибриногена в плазме уменьшилось на 21 % (Табл. 21).

Полученные результаты достоверно свидетельствуют о нарушении всех основных функций печени (антитоксической, синтетической и экскреторной) под действием токсиканта – тетрахлорметана.

Введение экспериментальным животным препарата сравнения Легалон[®] 140 после интоксикации CCl_4 приводило к снижению продолжительности сна, за счет ускорения элиминации барбитурата, что свидетельствует об улучшении антитоксической функции печени на фоне действия токсиканта. На восстановление экскреторной функции указывает снижение ретенции БСФ у экспериментальных животных на 61 % по сравнению с контролем. Данные таблицы 21 свидетельствуют об улучшении синтетической функции печени, так возросло содержание ЛПВП в сыворотке и ОБ в плазме на 13 % и 9 %

соответственно, а уровень глюкозы в крови снизился на 27 % по сравнению с контрольной группой животных.

Таким образом, введение препарата сравнения Легалон® 140 обладает выраженным гепатопротекторным действием, улучшая антитоксическую, синтетическую и экскреторную функции печени животных с острым токсическим гепатитом.

Введение исследуемой группе животных с острым токсическим гепатитом водно-спиртового извлечения надземной части сосюреи горькой в течение 7 дней оказывало положительное влияние на функции печени (табл. 21).

О снижении воспалительных процессов в органе свидетельствует уменьшение массы печени по сравнению с контролем на 19 %. Под влиянием извлечения ретенции БСФ снизилась на 55 %, продолжительность гексобарбиталового сна уменьшилась на 37 % по сравнению с данным показателем контрольной группы животных, что свидетельствует о восстановлении экскреторной и антитоксической функции печени. Результаты, представленные в таблице 21, доказывают, что извлечение из надземной части сосюреи горькой влияет на синтетическую функцию печени животных с острым токсическим гепатитом: в сыворотке крови увеличилось содержание ЛПВП на 16 %, в плазме крови количество ОБ и ФГ возросло на 8 % на 19 % соответственно.

Полученные результаты достоверно свидетельствуют, что водно-спиртовое извлечение сосюреи горькой на 70 % спирте этиловом обладает выраженным гепатопротекторным эффектом, так как под его действием осуществляется восстановление экскреторной, антитоксической и синтетической функции печени животных с острым токсическим гепатитом.

Таким образом, обобщая результаты главы 4, можно сделать вывод о том, что водно-спиртовые извлечения, полученные методом реперколяции на 40 и 70 % этаноле, из сосюреи горькой обладают низкой токсичностью (IV класс – «вещества малоопасные»).

Скрининговые исследования фармакологической активности 70 % водно-спиртового извлечения из надземной части сосюреи горькой выявили

противоописторхозный и гепатопротекторный эффекты. Сочетание указанных фармакологических эффектов уникально, так как позволяет комплексно проводить антигельминтную терапию и профилактику повреждения клеток печени, которое неизбежно возникает при лечении гельминтозов синтетическими препаратами. При этом противоописторхозная активность связана с наличием сесквитерпеновых лактонов, а гепатопротекторная – с наличием флавоноидов, что является основанием разработки методик их обнаружения и количественного определения при стандартизации лекарственного растительного сырья «Соссюреи горькой трава».

Важным вопросом при внедрении нового лекарственного растительного сырья является оценка его сырьевых запасов. Для решения данной задачи нами были проведены ресурсоведческие исследования в пределах естественного ареала соссюреи горькой – в Омской области.

На следующем этапе встает вопрос о разработке проекта нормативной документации ФС «Соссюреи горькой трава». Для обоснования разработанных показателей использовали принципы и методы фармакогностического анализа.

Результаты оценки гепатопротекторной активности водно-спиртового извлечения сосюреи горькой (200 мг/кг) и препарата сравнения Легалон® 140 (100 мг/кг) на модели острого токсического гепатита (n = 8 X ± m, X – среднее значение, m – доверительный интервал)

Мт	Мп	К	ПГС	Р БСФ	АЛАТ	АСАТ	ЛПВП	ОХ	ОБ	ФГ	Г
Интактные (n=10)											
317±	12,06±0,3	3,80±	14,2±	5,2±	35,4±	50,1±	1,51±	2,06±	58,04±	2,64±	5,8±
2		0,10	1,7	1,8	2,7	3,5	0,03	0,05	0,75	0,09	0,1
Контроль (n=10)											
322±	15,82±	4,91±	28,3±	11,9±	50,6± 3,5*	80,3±	1,29±	1,82±	49,97±	2,18±	7,5±
3	0,2*	0,11*	1,4*	1,2*		5,7*	0,08*	0,07*	1,87*	0,05*	0,4*
Сосюрея горькая (n=8)											
306±	306±	306±	306±	306±	306±	306±	306±	306±	306±	306±	306±
4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
Легалон® 140 (n=8)											
311±	13,17±	4,23±	17,4±	7,4±	39,8±	57,2±	1,48±	1,89±	54,81±	2,69±	5,9±
6	0,4#	0,16*#	2,1#	1,7#	1,8	2,4#	0,09	0,02*	1,62#	0,10#	0,5#

Примечание: * – p<0,05 по сравнению с исходными значениями; # – p<0,05 по сравнению с контролем.

Мт (г) – масса тела, Мп (г) – масса печени, К (%) – коэффициент «масса печени/масса тела», ПГС (мин) – продолжительность гексеналового сна, Р БСФ (%) – ретенция бромсульфалеина, АЛАТ и АСАТ (Е/л) – активность ферментов аланинаминотрансферазы и аспаргатаминотрансферазы в сыворотке крови, ЛПВП (мМ/л) – липопротеидов высокой плотности, ОХ (мМ/л) – общего холестерина, ФГ и ОБ (г/л) – содержание в плазме крови фибриногена и общего белка, Г (ммоль/л) – уровень глюкозы в цельной крови крыс с острым токсическим гепатитом.

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА РЕСУРСНЫХ ЗАПАСОВ И МОРФОЛОГО-АНАТОМИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СОССЮРЕИ ГОРЬКОЙ

5.1. Ресурсоведческие исследования соссюреи горькой на территории Омской области

По результатам изучения картографических материалов были составлены маршруты обследования на территории Омской области. Учитывая приуроченность растения к солонцам черноземно-луговым, растительным сообществам типа травяные болота и галофитные луга и фитоценозам разнотравно-злакового типа, что характерно для лесостепной и степной зоны, направление выбирали с учетом зонирования территории Омской области.

Сырье было собрано в различных эколого-фитоценологических условиях, в местах, удаленных от дорог (не менее 100 метров) и крупных промышленных предприятий. Заготовка сырья проводилась в ходе ресурсоведческих экспедиционных исследований на территории Калачинского, Крутинского, Любинского, Марьяновского, Москаленского, Называевского, Нововаршавского, Оконешниковского, Омского, Таврического, Тюкалинского, Черлакского районов Омской области в 2010-2012 гг.

Всего исследована 221 заросль соссюреи горькой на территории Омской области. Оборот заготовки устанавливался экспериментально и равен трем.

Определение запасов растительного сырья проводили на конкретных зарослях методом модельных экземпляров, результаты проведенных ресурсоведческих исследований представлены в табл. 22.

Таблица 22

Сводная опись запасов соссюреи горькой на территории Омской области

№ п/п	Административный район	Кол-во исслед. зарослей	Общая площадь зарослей, га	БЗ, кг	ЭЗ, кг	ВЕОЗ, кг	ВЕОЗ на 1 га, кг/га
1.	Омский	13	4,97	10108,9±768,9	8571,3	2857,1	574,9
2.	Калачинский	15	0,24	649,9±59,9	530,23	176,7	736,4
3.	Оконешниковский	32	6,47	19831,2±916,2	17998,9	5999,6	927,3
4.	Черлакский	25	0,42	1737,4±113,0	1642,5	547,5	1303,5

Продолжение таблицы 22

5.	Нововаршавский	16	0,99	2457,1±196,8	2063,5	687,8	694,8
6.	Таврический	10	1,14	2966,4±174,8	2616,9	872,3	765,2
7.	Крутинский	30	6,2	36367,8±5904,6	25558,7	4207,9	678,7
8	Называевский	29	18,56	65657,9±4760,6	56136,6	18712,2	1008,2
9	Москаленский	13	1,71	5294,8±296,2	4702,5	1567,5	916,7
10	Марьяновский	11	0,96	3892,9±219,5	3454,1	1151,4	1199,3
11	Тюкалинский	12	1,47	3247,1±362,4	2522,4	840,8	571,9
12	Любинский	15	1,13	5890,1±234,8	5420,5	1806,8	574,9
	Всего	221	54,52	158101,7±13772,7	131217,8	39427,6	

Таким образом, наиболее перспективными районами с точки зрения заготовки запасов сырья сосюреи горькой являются Черлакский, Марьяновский и Называевский районы Омской области. Всего на территории Омской области можно заготовить около 40 тонн сырья травы сосюреи горькой.

5.2. Морфолого-анатомическое исследование сосюреи горькой

Помимо оценки ресурсных возможностей нового вида растительного сырья «Сосюреи горькой трава», необходимо разработать проект фармакопейной статьи, включающий в себя весь комплекс фармакогностических исследований, в том числе и морфолого-анатомическое изучение надземной части данного растения.

Знание морфолого-анатомических особенностей лекарственного растительного сырья представляет не только научный, но и практический интерес. Во-первых, современные требования по внедрению в медицинскую практику новых видов лекарственного растительного сырья включают в себя не только детальное исследование фармакологических свойств и химического состава, но и разработку методик диагностики сырья по их морфолого-анатомическим признакам. Во-вторых, полученные данные могут быть использованы для решения теоретических вопросов систематики с целью объективной оценки различий между систематически близкими, но морфологически трудно различимыми видами.

И, в-третьих, известно, что многие официальные лекарственные растения имеют близкие по систематическому положению, морфологическим признакам, местообитанию виды, которые ошибочно могут быть заготовлены в качестве ЛРС.

Материалом для исследования служили побеги сосюреи горькой, собранные в фазу массового цветения на территории Омской области.

Морфологические признаки сосюреи горькой изучены достаточно подробно и приведены во Флоре СССР, том XXIV, на данном этапе нашей задачей явилось выделение диагностически значимых признаков для создания и оформления проектов нормативной документации: ФС «Сосюреи горькой трава» и «Инструкция по сбору, сушке и хранению травы сосюреи горькой».

Необходимо отметить, что признаки растения и диагностически значимые признаки, используемые для оценки подлинности лекарственного сырья, имеют различия, связанные: во-первых, с выбором гистологической группы ЛРС, во-вторых со временем заготовки ЛРС.

В момент заготовки сырья «Сосюрея горькая трава» практически отсутствуют прикорневые и нижние стеблевые листья с длинным черешком, эллиптические или продолговато-эллиптические, заостренные, цельнокрайние или выемчато-зубчатые, зубцы неравные, иногда вытянутые, так как они отмирают, соответственно для диагностики ЛРС они теряют значение. Необходимо отметить, что при сушке сырья сосюреи горькой проходят процессы созревания семян, поэтому в сырье отмечается значительное количество цветков с сеянками.

Таким образом, анализируя данные Флоры СССР, том XXIV, можно сделать вывод, что наиболее значимыми морфологическими признаками травы сосюреи горькой являются:

- стебли ребристые, шероховатые, голые;
- листья стеблевые короткочерешковые или сидячие, цельнокрайние, с обеих сторон зеленые, снизу бледнее и с многочисленными железками;

- корзинки колокольчатые, собраны в щитковидное соцветие; обертки черепитчатые, коротко-волосистые или слегка паутинистые; наружные листочки обертки короткие, ланцетные, острые или на верхушке зубчатые, средние – на верхушке расширенные в округлые, пленчатые, по краям зазубренные придатки розового цвета, самые внутренние листочки узкие, почти без придатков;
- ложе корзинки густо покрыто линейно-шиловидными, блестящими, неравными пленками;
- все цветки в корзинке обоеполые, трубчатые, фиолетово-розовые; пыльники белые, придатки пыльников коротко и слабо волосистые.

Макроскопические признаки растений не всегда позволяют достоверно провести диагностику видов, особенно в случае полиморфизма растений, тем более что в настоящее время лекарственное растительное сырье используется, в основном, в измельченном виде, что затрудняет его диагностику по морфологическим признакам. Использование микроскопического анализа позволяет дать объективную оценку подлинности цельного и измельченного растительного сырья.

При рассмотрении микропрепаратов листа с поверхности на верхней стороне видны многоугольные прямостенные клетки эпидермиса, некоторые со слабоволнистым контуром, с ясно выраженной лучисто-морщинистой складчатостью кутикулы (рис. 8, А).

Клетки нижнего эпидермиса со слабоизвилистыми стенками, складчатость кутикулы выражена слабее (рис. 8, Б). Устьица аномоцитного типа, расположены, в основном, на нижней стороне листа (рис. 8, А, Б). Волоски простые и железистые, расположены, в основном, на нижней стороне листа. Простые волоски двух типов: 1) нитевидные, многоклеточные, прямые или изогнутые, с тупой верхушкой, состоящие из 2-6 клеток (рис. 8, В); многоклеточные, расширенные у основания, с заостренной верхушкой, состоящие из 2-3 клеток (рис. 8, Г). Железистые «булавовидные» волоски состоят из 1-2 клеток в основании и многоклеточной овальной головки, заполненной желтовато-коричневым содержимым (рис. 8, Д). На нижней стороне листа встречаются

сидячие «куполообразные» железки, клетки эпидермиса у места их прикрепления образуют розетку (рис. 8, Е, Ж).

Самый крупный пучок занимает центральное положение, закрытый коллатеральный (рис. 8, З). С боков от него расположены еще два-три пучка такого же типа. Над ксилемой и флоэмой колленхиматозная обкладка более выражена со стороны флоэмы.

Эпидермис листочков обертки состоит из веретенообразных клеток с ровными стенками. Имеется опушение из многочисленных коротких сосочковидных одноклеточных и длинных многоклеточных тонкостенных волосков (рис. 9, А, Б).

При рассмотрении цветков с поверхности видны клетки эпидермиса, стенки которых изменяются от слабо- до сильноизвилистых (рис. 10, А). На трубке венчика изредка встречаются два типа трихом: железистые «булавовидные» волоски и крупные волоски, состоящие из многоклеточной ножки и шаровидной головки (рис. 10, Б, В). Пыльца округлая шиповатая трехпоровая.

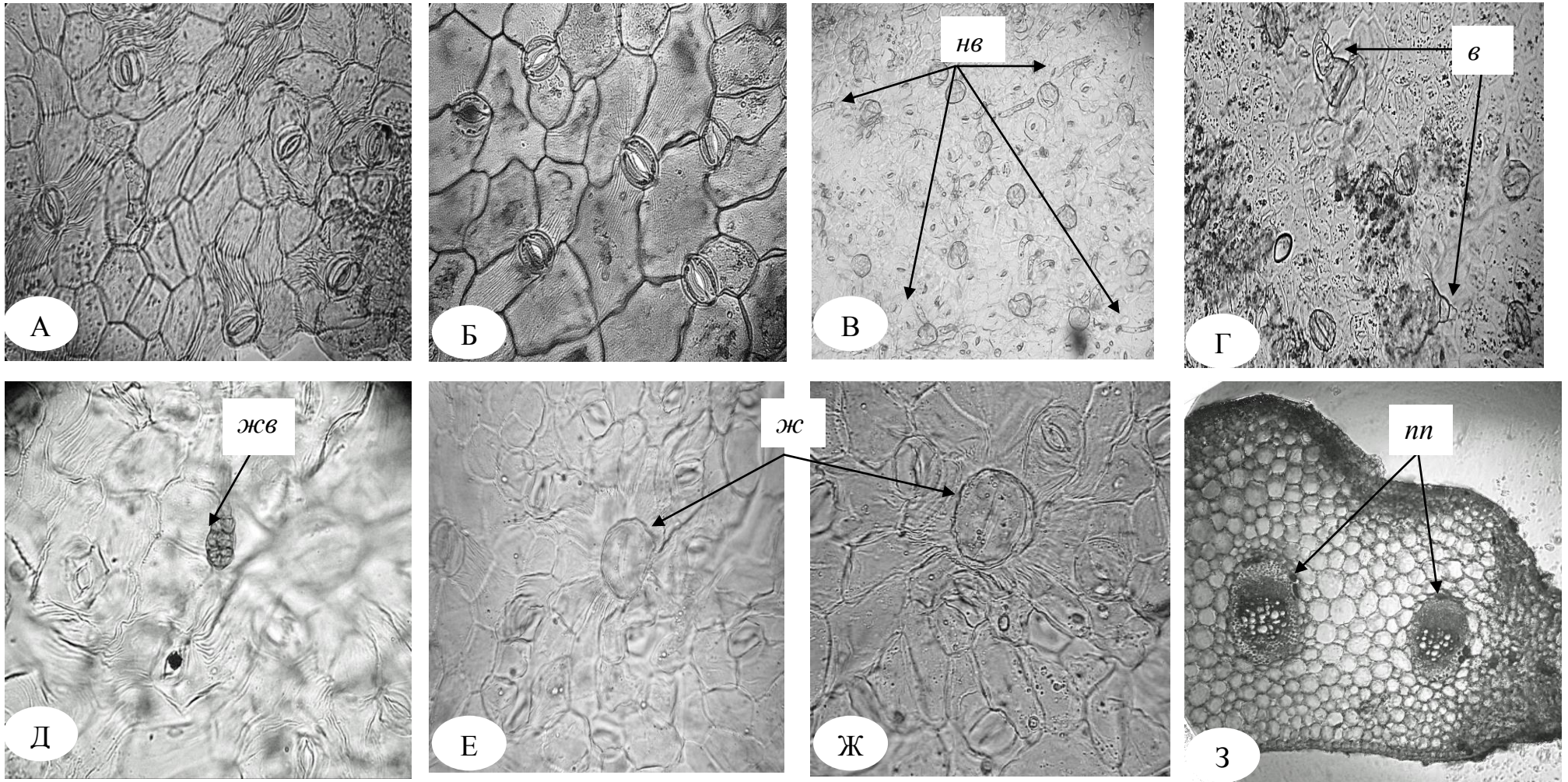


Рис. 8. Сосюрея горькая (*Saussurea amara* (L.) DC.). Клетки верхнего (А) и нижнего (Б) эпидермиса листа. Нижний эпидермис листа с простыми волосками (В, Г): *нв* – нитевидные волоски; *в* – волоски, расширенные у основания. Нижний эпидермис листа с железистыми волосками (Д, Е, Ж): *жсв* – железистые «булавовидные» волоски; *жс* – «куполообразные» железки. Поперечный срез листа сосюреи горькой (З) : *пп* – проводящие пучки

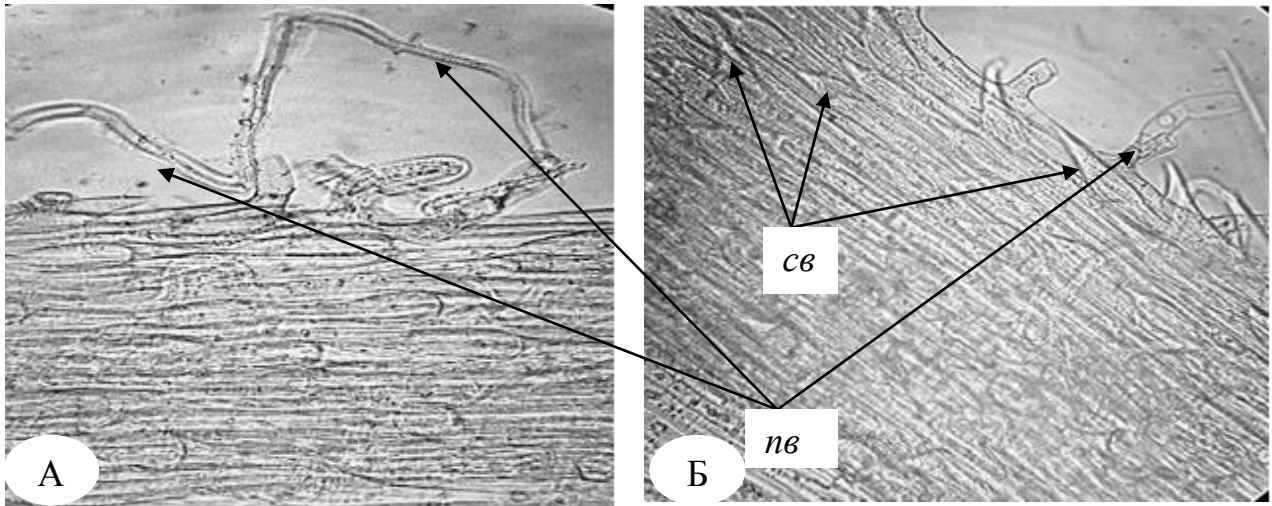


Рис. 9. Соссюрея горькая (*Saussurea amara* (L.) DC.). Эпидермис листочка обертки (А, Б), сосочковидные выросты и простые волоски: *св* – сосочковидные выросты, *пв* – простые волоски.

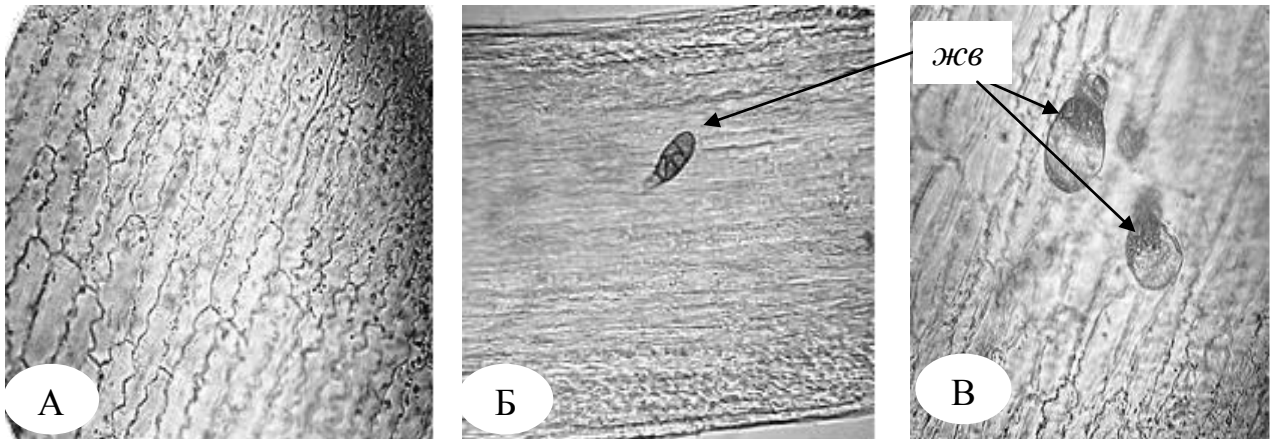


Рис. 10. Соссюрея горькая (*Saussurea amara* (L.) DC.). Эпидермис трубчатого цветка (А), с железистыми волосками (Б, В) *жв* – железистые волоски.

Клетки эпидермиса стебля многоугольные с прямыми стенками, с редко встречающимися нитевидными волосками и железками, такими же, как на листе (рис. 11, А, Б).

Проводящая система стебля имеет переходное строение (от пучкового к непучковому), пучки открытые коллатеральные (рис. 11, В). Такое строение характерно для многих сложноцветных и не может являться диагностическим признаком.

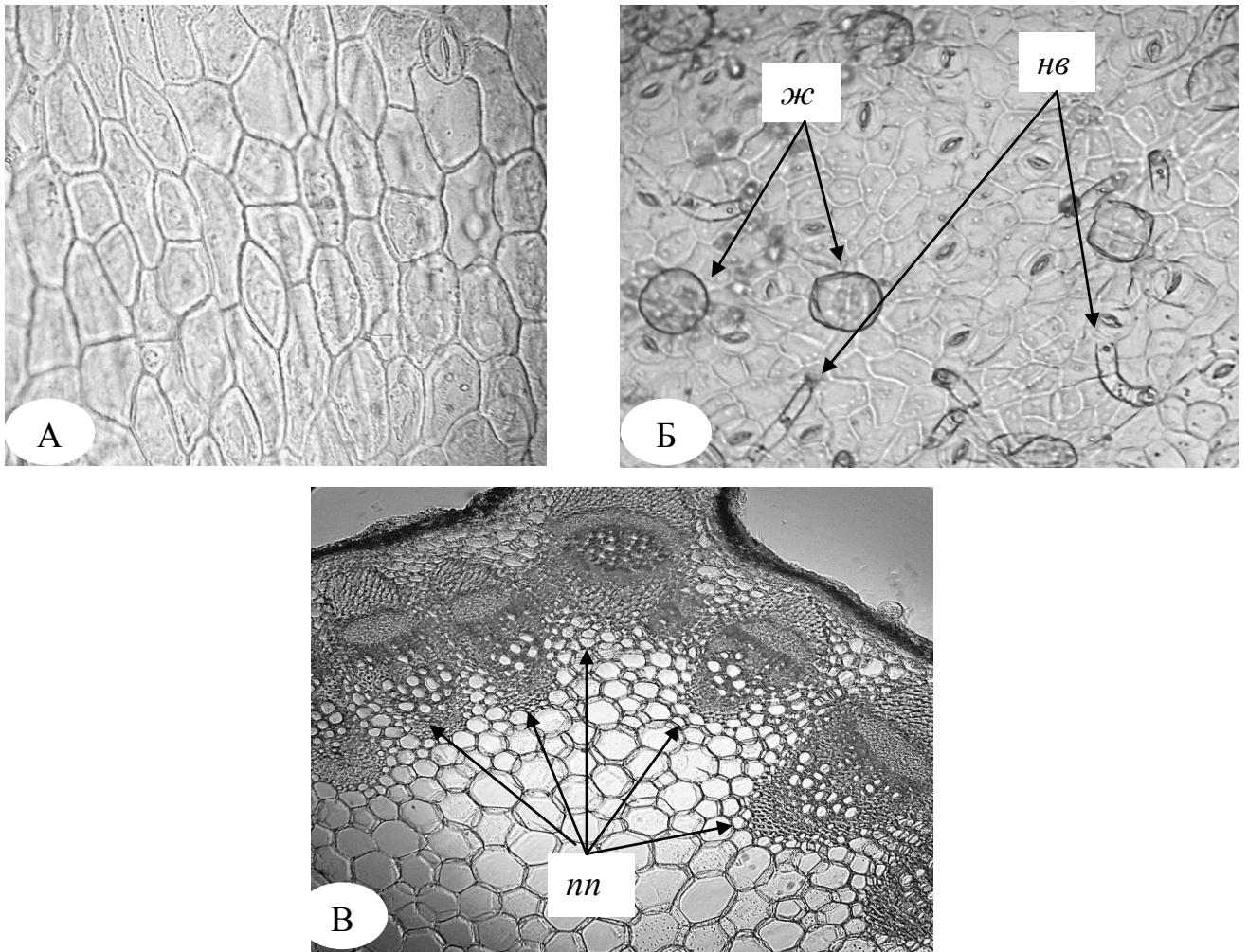


Рис. 11. Соссюрея горькая (*Saussurea amara* (L.) DC.). Эпидермис стебля, многоугольные клетки (А), железки и нитевидные волоски (Б): *ж* – железки, *нв* – нитевидные волоски. Поперечный срез стебля (В), переходное строение (от пучкового к непучковому) стебля соссюреи горькой, пучки открытые коллатеральные: *пп* – проводящие пучки.

По результатам проведенного микроскопического и гистохимического исследования нами выявлен ряд анатомических признаков характерных для надземной части соссюреи горькой:

- клетки верхнего эпидермиса листа с ясно выраженной лучисто-морщинистой складчатостью кутикулы;
- волоски трех типов: 1) нитевидные, многоклеточные, прямые или изогнутые, с тупой верхушкой, состоящие из 2-6 клеток; 2) многоклеточные, расширенные у основания, с заостренной верхушкой, состоящие из 2-3 клеток; 3) железистые «булавовидные» волоски, состоящие из 1-2 клеток в основании и

многоклеточной овальной головки, заполненной желтовато-коричневым содержимым;

- на нижней стороне листа встречаются сидячие «куполообразные» железки, клетки эпидермиса у места их прикрепления образуют розетку;

- эпидермис листочков обертки состоит из веретенообразных клеток с ровными стенками, имеется опушение из многочисленных коротких сосочковидных одноклеточных и длинных многоклеточных тонкостенных волосков;

- эпидермис трубчатых цветков состоит из клеток с извилистыми стенками, встречаются два типа трихом: крупные железистые волоски, состоящие из многоклеточной ножки и шаровидной головки, и железистые «булавовидные» волоски такого же строения, как на листе.

Таким образом, Омская область может являться перспективным регионом для заготовки сырья сосюреи горькой.

В результате проведенного морфолого-анатомического исследования надземной части сосюреи горькой были выявлены диагностически значимые признаки, которые целесообразно использовать при разработке проекта фармакопейной статьи «Сосюреи горькой трава» и Инструкции по сбору, сушке и хранению сосюреи горькой.

ГЛАВА 6. РАЗРАБОТКА ПРОЕКТА ФАРМАКОПЕЙНОЙ СТАТЬИ «СОССЮРЕИ ГОРЬКОЙ ТРАВА»

Согласно проведенным нами исследованиям соссюрея горькая широко распространена на территории Сибири, доминирующими группами БАВ являются флавоноиды и сесквитерпеновые лактоны. В результате скрининговых фармакологических исследований извлечений соссюреи горькой был выявлен низкий уровень токсичности и установлено уникальное сочетание противоописторхозного и гепатопротекторного эффектов.

Таким образом, соссюрея горькая является перспективным объектом для внедрения в медицинскую практику.

Для этого необходимо разработать проект фармакопейной статьи, регламентирующей подлинность и доброкачественность лекарственного растительного сырья, «Соссюреи горькой трава».

В проекте ФС описаны внешние признаки сырья, экспериментально определены его числовые показатели, а также приведены методики качественного обнаружения и количественного определения основных групп биологически активных веществ (Приложение № 1).

В Инструкции по заготовке, сушке и хранению описаны морфологические признаки надземной части соссюреи горькой, условия заготовки, особенности сушки и правила хранения травы соссюреи горькой (Приложение № 2).

6.1. Разработка показателей ФС «внешние признаки» и «микроскопия»

Для внедрения проекта ФС «Соссюреи горькой трава» необходимо определить показатели регламентирующие подлинность лекарственного растительного сырья, а именно диагностические макро- и микроскопические признаки. Полученные данные подробно изложены в главе 3 (раздел 3.2.) и войдут в разделы ФС «Внешние признаки» и «Микроскопия» и в Инструкцию по заготовке, сушке и хранению травы соссюреи горькой [85].

Внешние признаки. *Цельное сырье* Смесь цельных или частично измельченных олиственных побегов длиной до 30 см. Стебли округлые ребристые, шероховатые, голые. Листья короткочерешковые или сидячие, иногда

немного низбегающие, цельнокрайние 2-10 см длины, 0,15-1,5 см ширины. Корзинки колокольчатые 1,5-3,0 см шириной в виде щитковидного соцветия. Обертки черепитчатые, коротко-волосистые или слегка паутинистые. Наружные листочки их короткие, ланцетные, острые или на верхушке зубчатые, средние – на верхушке расширенные в округлые, пленчатые, по краям зазубренные, прицветки розового цвета; самые внутренние листочки узкие, почти без прицветков. Цветоложе густопленчатое; пленки линейно-шиловидные, блестящие, неравные, до 7 мм длиной. Цветы фиолетово-розовые, пыльники белые. Прицветки пыльников коротко и слабо волосистые. Цвет стеблей и листьев серовато-зеленый, запах своеобразный ароматный, вкус водного извлечения горький.

Измельченное сырье. Кусочки корзинок, отдельных цветков, листьев, стеблей различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм. Цвет серовато-зеленый с фиолетово-розовыми вкраплениями. Запах своеобразный ароматный, вкус водного извлечения горький.

Порошок. Порошок травы серовато-зеленого цвета с фиолетово-розовыми вкраплениями, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Запах своеобразный ароматный, вкус водного извлечения горький.

Микроскопия. При рассмотрении микропрепаратов с поверхности листа видны клетки эпидермы, многоугольные прямостенные, некоторые со слабо волнистым контуром. Кутикула с ясно выраженной лучисто-морщинистой складчатостью хорошо выражена на верхней эпидерме. На нижней эпидерме кутикула гладкая.

Устьица аномоцитного устьичного типа преобладают они на нижней стороне. Волоски простые и железистые 3-х типов: нитевидные, многоклеточно-прямые и изогнутые, тупо-верхушечные, состоящие из 2-6 клеток; многоклеточные, расширенные у места прикрепления и железистые «булавовидные» волоски, состоящие из одной-двух клеток в основании и многоклеточной овальной головки, заполненной желтовато-коричневым содержимым. Железки куполообразного строения, на месте прикрепления образуют розетку.

Эпидермис листочков обертки состоит из веретенообразных клеток с ровными стенками. На эпидермисе, особенно у места прикрепления много сосочковидных островерхущечных выростов. Кроме того, по краям видны простые многоклеточные тонкостенные волоски.

При рассмотрении трубчатых цветков с поверхности видны клетки, стенки которых изменяются от ровных до сильноизвилистых.

На венчике встречаются два типа трихом: железистые «булавовидные» волоски и крупные волоски, состоящие из многоклеточной ножки и шаровидной головки.

6.2. Разработка методики качественного обнаружения сесквитерпеновых лактонов и флавоноидов в траве соссюреи горькой

Для определения подлинности наряду с «Внешними признаками» и «Микроскопией» нормативная документация должна содержать описание методик качественного обнаружения действующих веществ. Для разработки методики оценки подлинности нами были использованы результаты химико-фармакологического исследования травы соссюреи горькой, которое выявило ведущую роль в проявляемой фармакологической активности двух групп БАВ, флавоноидов и сесквитерпеновых лактонов.

Таким образом, полученные данные позволили обосновать выбор флавоноидов и сесквитерпеновых лактонов, как групп веществ, достоверно указывающих на подлинность травы соссюреи горькой.

Для разработки методики количественного определения сесквитерпеновых лактонов нами был предложен метод высокоэффективной жидкостной хроматографии, одним из важным преимуществ которого является одновременное качественный анализ и количественное определение доминирующего сесквитерпенового лактона – цинаропикрина.

Для качественного обнаружения флавоноидов нами предложен метод хроматографии в тонком слое сорбента, так как фармакопейные реакции обнаружения флавоноидов (цианидиновая проба, реакция с 5 % спиртовым

раствором алюминия хлоридом) затруднены из-за окраски извлечений соэкстрактивными веществами (пигменты).

Отсюда следует, что в проект ФС «Соссюреи горькой трава» нами включена методика качественного обнаружения сесквитерпеновых лактонов по результатам ВЭЖХ-анализа. Для обнаружения флавоноидов предложен метод ТСХ, при этом для увеличения достоверности результатов нами предложено проводить сравнение с государственным стандартным образцом лютеолин-7-глюкозида (Fluka CAS 49968).

Качественные реакции. *Сесквитерпеновые лактоны.* На хроматограмме испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение») время удерживания основного пика цинаропикрина должно совпадать со временем удерживания пика на хроматограмме РСО цинаропикрина и составлять около 11,25 мин.

Флавоноиды. Аналитическую пробу сырья травы соссюреи горькой измельчат до величины частиц проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1,0 г сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл 70 % этанола, нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником 10 мин. После охлаждения полеченное извлечение фильтруют через бумажный фильтр.

На линию старта хроматографической пластинки «Сорбфил» размером 10×10 см в виде точки микропипеткой 0,02 мл полученного раствора и 0,02 раствора ГСО лютеолин-7-глюкозида. Пластинку сушат на воздухе в течение 10 мин, затем помещают в камеру, предварительно насыщенную не менее 1 ч, со смесью растворителей: этилацетат–муравьиная кислота–уксусная кислота ледяная–вода (100:11:11:26) и хроматографируют восходящим методом. Когда фронт растворителей пройдет 8 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 10 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм и 365 нм, опрыскивают спиртовым 5 %-ным раствором алюминия хлорида. На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции на уровне зоны адсорбции на хроматограмме

раствора ГСО лютеолин-7-глюкозида желто коричневого цвета с R_f около 0,6. На хроматограмме испытуемого раствора кроме основной зоны адсорбции допускается наличие дополнительных зон адсорбции голубого цвета с R_f около 0,45 и 0,9 (хлорогеновая и кофейная кислоты соответственно).

Примечания: 1. *Подготовка пластинок.* Пластины «Сорбфил» перед использованием активируют в сушильном шкафу при 100–105 °С в течение 1 ч. Пятна исследуемых растворов наносят поперек линиям накатки.

2. *Приготовление ГСО раствора лютеолин-7-глюкозида.* 0,01 (т.н.) г лютеолин-7-глюкозида помещают в мерную колбу на 25 мл, добавляют 10 мл 95% спирта, растворяют на кипящей водяной бане, остужают до комнатной температуры и доводят 95% спиртом до метки.

6.3. Разработка методики количественного определения флавоноидов и сесквитерпеновых лактонов в траве соссуреи горькой

По результатам фитохимических и фармакологических исследований установлено, что в траве соссуреи горькой важнейшими группами БАВ являются флавоноиды (апигенин, лютеолин и их гликозиды) и сесквитерпеновые лактоны (цинаропикрин, репин, гроссгемин), поэтому целесообразно проводить стандартизацию сырья по этим группам БАВ.

Количественное содержание сесквитерпеновых лактонов (в пересчете на цинаропикрин) в 7 исследуемых образцах проводили методом ВЭЖХ, учитывая преимущества данного метода: возможность одновременного проведения качественного и количественного анализа и отсутствие длительной пробоподготовки.

Качественный и количественный анализ исследуемых образцов проводили методом обращенно-фазовой ВЭЖХ высокого давления на приборе Shimadzu LC-20 Prominence в изократическом режиме в следующих условиях:

- аналитическая колонка, заполненная сорбентом PerfectSil 300 ODS C18, 4,6 x 250 мм, с размером частиц 5 мкм;
- состав подвижной фазы: метанол – вода в соотношении 50:50;
- детектирование при длине волны 204 нм;

- температура колонки - комнатная;
- скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин;
- объем вводимой пробы 20 мкл.

Количественное содержание цинаропикрина в исследуемых образцах в процентах определяли методом сравнения с рабочим стандартным образцом (PCO) цинаропикрина, полученного методом препаративной высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Количественное определение. *Сесквитерпеновые лактоны.*

Аналитическую пробу сырья травы сосюреи горькой измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 0,1 измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 5 мл экстрагента (хлороформ-спирт этиловый 4:1), присоединяют к обратному холодильнику на водяной бане при температуре 55-60°C в течение 10 мин. Экстракцию повторяют в указанных выше условиях трижды. Затем колбу охлаждают, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр, полученный раствор упаривают в вакууме. К сухому остатку приливают 10 мл подвижной фазы, растворяют и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл. Доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают. 0,02 мл раствора вводят в хроматограф.

Приготовление рабочего стандартного образца цинаропикрина: Около 0,005 (т.н.) PCO цинаропикрина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, приливают 10 мл подвижной фазы, нагревают на водяной бане до полного растворения образца и охлаждают. Доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают. 0,02 мл раствора вводят в хроматограф. Срок годности полученного раствора 1 сутки.

Обработку результатов производили с использованием программного обеспечения LC Solutions.

Содержание цинаропикрина X (%), в пересчете на массу сырья в траве сосюреи горькой, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S_1 \times a_0 \times P \times 100 \times 100}{S_0 \times a_1 \times 100 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

S_0 – площадь пика на хроматограмме раствора РСО цинаропикрина (по данным LC Solutions);

S_1 – площадь пика цинаропикрина на хроматограмме испытуемого раствора (по данным LC Solutions);

a_0 – навеска РСО цинаропикрина, в г;

a_1 – навеска сырья сосюреи горькой, в г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, в %;

P – содержание цинаропикрина в рабочем стандартном образце цинаропикрина, в %.

Результаты анализа образцов сосюреи показали, что содержание сесквитерпеновых лактонов в пересчете на цинаропикрин в исследуемом сырье составляет $0,608 \pm 0,024$ %. Статистическая обработка результатов количественного определения сесквитерпеновых лактонов представлена в таблице 12.

Важнейшим критерием оценки аналитической методики служит доказательство ее валидности, включающей взаимосвязанную систему характеристик – специфичность, линейность, прецизионность (воспроизводимость) и точность [3, 14, 120, 148].

Специфичность методики подтверждалась совпадением времени удерживания анализируемого компонента и РСО цинаропикрина (рис. 12, 13). Пики сопутствующих и родственных соединений, входящих в состав извлечения сосюреи горькой, хорошо разделяются с пиком цинаропикрина, время удерживания которого 11,25 мин, и не влияют на аналитическое определение.

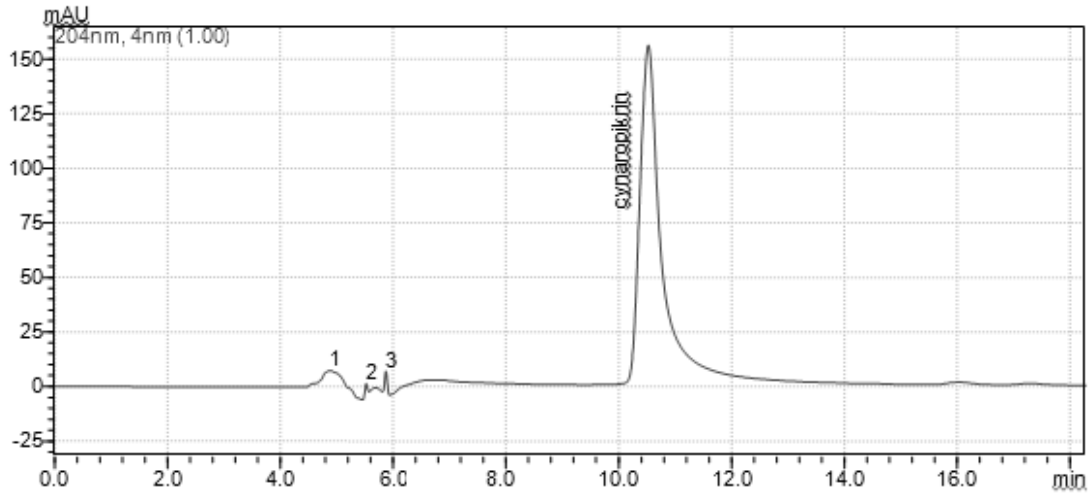


Рис. 12. Хроматограмма рабочего стандартного образца цинаропикрина
По оси абсцисс – время удерживания, мин; по оси ординат – высота пика, mAU

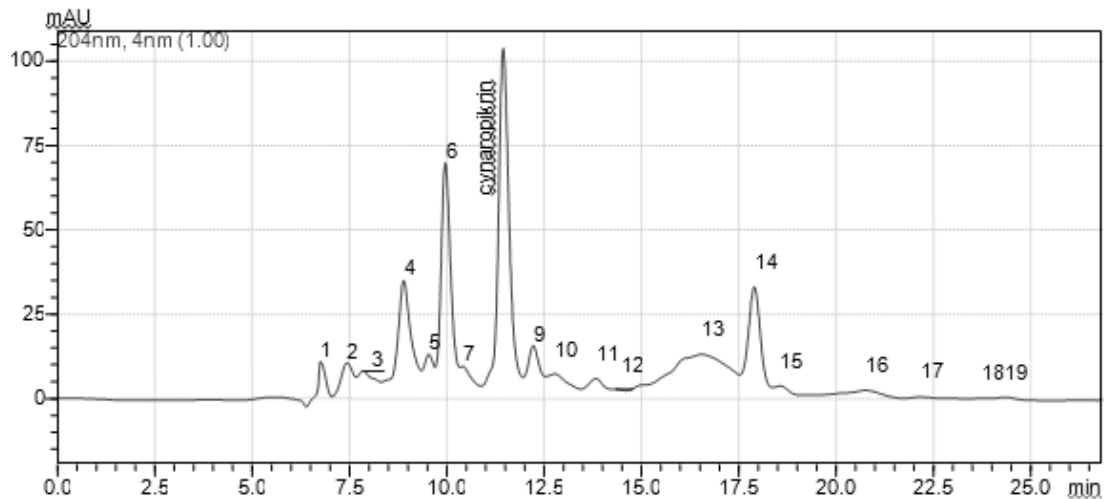


Рис. 13. Хроматограмма извлечения сосюреи горькой
(цинаропикрин $t_R=11,25$)

По оси абсцисс – время удерживания, мин; по оси ординат – высота пика, mAU

Линейность и аналитическая область методики была подтверждена анализом 7 проб разных концентраций в диапазоне от 70 % до 130 % от концентрации принятой за 100 %. Сравнение зависимости между содержанием цинаропикрина (мг/мл) в испытуемых растворах и величинами площадей хроматографических пиков показало, что она имеет линейный характер.

Результаты исследований представлены в табл. 23, графическая зависимость отражена на графике (рис. 14).

Таблица 23

Результаты определения линейности методики определения сесквитерпеновых лактонов в траве сосюреи горькой

№ п/п	Концентрация цинаропикрина, мг/мл	Площадь пика цинаропикрина, мВ·с
1	0,425	469,99
2	0,485	537,13
3	0,544	604,27
4	0,612	671,41
5	0,670	738,55
6	0,733	805,69
7	0,786	872,84

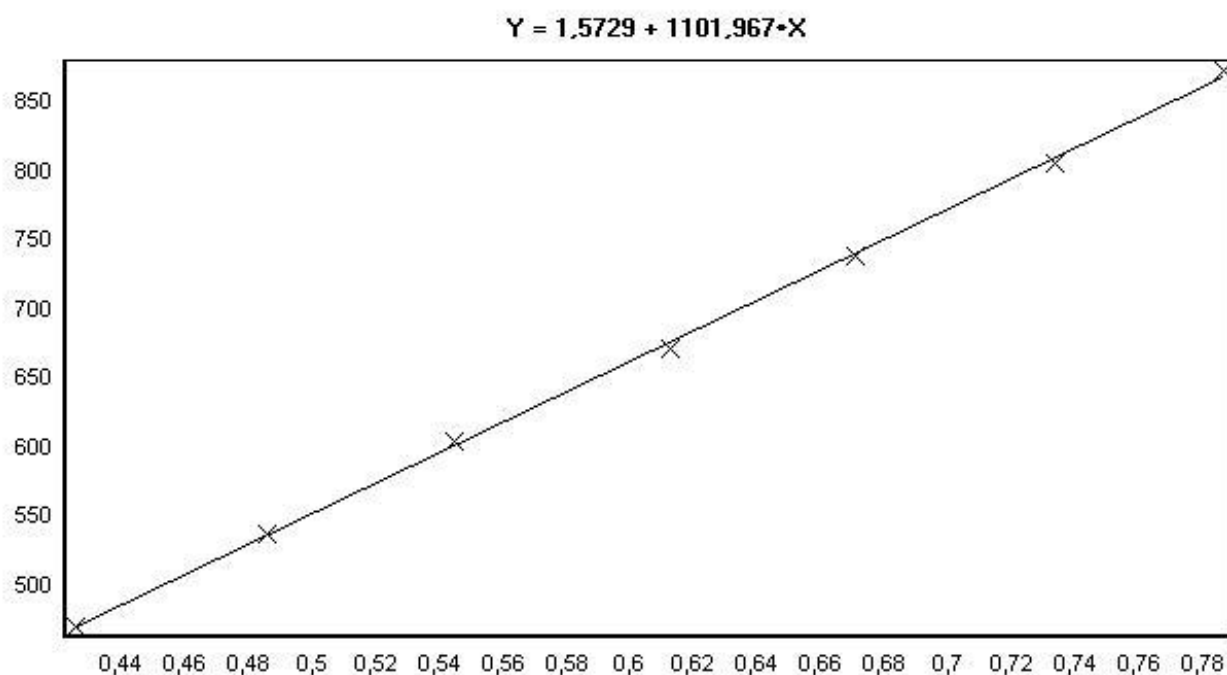


Рис. 14. Градуировочный график зависимости площадей хроматографических пиков от содержания цинаропикрина в траве сосюреи горькой

По оси абсцисс – содержание сесквитерпеновых лактонов, мг/мл; по оси ординат – площадь пика, мВ·с

Установлено, что в заданной области концентраций сесквитерпеновых лактонов в траве сосюреи горькой график имеет линейный характер и описывается уравнением $Y=1101,97 \cdot X+1,57$. Коэффициент корреляции (r) равен 0,999, что позволяет использовать данную методику для количественного определения сесквитерпеновых лактонов в данном диапазоне концентраций.

Для установления прецизионности (воспроизводимости) проводили 7 параллельных определений, затем вычисляли величину стандартного отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD) (табл. 24).

Таблица 24

Результаты определения прецизионности методики определения сесквитерпеновых лактонов в траве сосюреи горькой

№ п/п	Найденное содержание сесквитерпеновых лактонов, %	$(X_i - \bar{X})$	$[(X_i - \bar{X})^2] \times 10^{-6}$	Метрологические характеристики
1	0,606	-0,002	4	$\bar{X}=0,608 \%$ $SD=0,024$ $RSD=1,25 \%$
2	0,618	0,010	100	
3	0,605	-0,003	9	
4	0,615	0,013	169	
5	0,597	-0,011	121	
6	0,601	-0,007	49	
7	0,606	-0,002	4	

В разработанной методике величина относительного стандартного отклонения менее 5 %, что характеризует надежность анализа в выбранных условиях.

Для определения точности методики проанализировали 9 образцов травы сосюреи горькой на 3 уровнях концентраций в пределах аналитической области. Для оценки полученных результатов использовали открываемость (R), которая,

согласно требованиям нормативной документации, должна находиться в пределах $\pm 2\%$ [27].

В результате получены 9 значений открываемости, для которых вычисляли величину стандартного отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD) (табл. 25).

Таблица 25

Результаты определения точности методики определения сесквитерпеновых лактонов в траве сосюреи горькой

№ п/п	Уровень	Навеска сырья, в г	Найденное содержание СЛ, %	Расчетное содержание СЛ, %	Открываемость (R), %	$(R_i - \bar{R})$	$(R_i - \bar{R})^2$	Метрологические характеристики
1	1	0,0511	0,312	0,311	100,32	0,56	0,3136	$\bar{R} = 99,76\%$ SD=0,439 RSD=0,440 %
2	1	0,0508	0,311	0,311	100	0,24	0,0576	
3	1	0,0496	0,310	0,311	99,68	-0,08	0,0064	
4	2	0,1042	0,605	0,607	99,67	-0,09	0,0081	
5	2	0,1037	0,604	0,607	99,51	-0,25	0,0625	
6	2	0,1046	0,607	0,607	100	0,24	0,0576	
7	3	0,1512	0,901	0,901	100	0,24	0,0576	
8	3	0,1497	0,890	0,901	98,78	-0,98	0,9604	
9	3	0,1518	0,900	0,901	99,89	0,13	0,0169	

Результаты определения точности методики показали, что теоретические и экспериментальные значения количественного содержания сесквитерпеновых лактонов в траве сосюреи горькой практически полностью совпадают. Величина

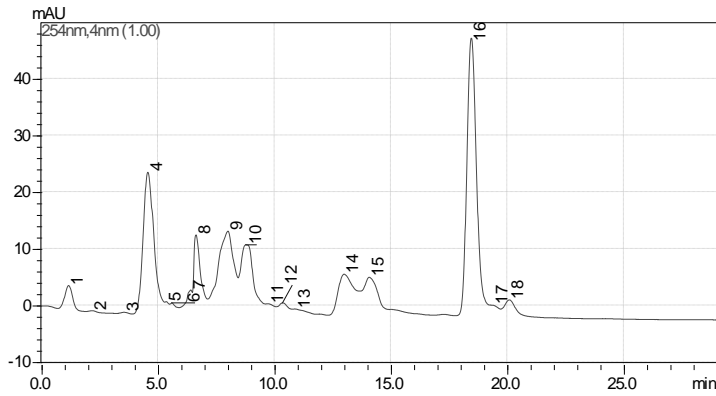
относительного стандартного отклонения (RSD) не превышает 5 %, а открываемость R составляет 99,76 %, что характеризует точность методики как удовлетворительную.

Установлено, что предлагаемая методика количественного определения сесквитерпеновых лактонов методом ВЭЖХ в траве соссюреи горькой является специфичной, воспроизводимой и точной, что предполагает рекомендовать данную методику для контроля качества лекарственного растительного сырья «Соссюреи горькой трава».

В соответствии с проектом ФС «Соссюреи горькой трава», содержание сесквитерпеновых лактонов должно быть не менее 0,5 %.

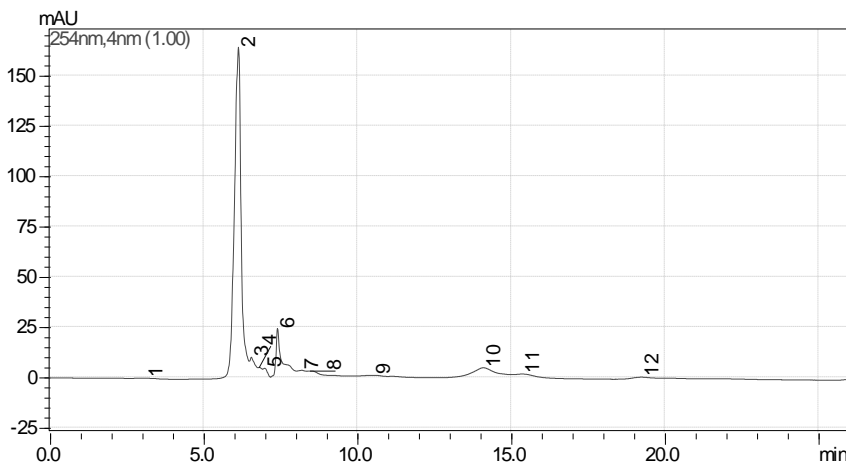
Для разработки методики количественного определения флавоноидов использовали 10 образцов сырья травы соссюреи горькой, собранных в различных местах её произрастания, при этом исследовали влияние на выход флавоноидов степени измельчения сырья, условий экстракции и концентрации этанола (табл. 26). Установлено, что максимальное количество флавоноидов извлекается из сырья при измельчении до размера частиц 1 мм. Экстрагирование флавоноидов лучше проводить 90 % этанолом при соотношении сырья и экстрагента 1:30. Для наиболее полного извлечения флавоноидов рекомендуем проводить трехкратную экстракцию из сырья по 30 минут.

В связи с тем, что флавоноиды в данном сырье содержатся преимущественно в виде гликозидов, проведено их извлечение этанолом, подкисленным кислотой хлористоводородной до pH=2-3 с целью гидролиза гликозидов флавоноидов (Рис. 15, 16). Результаты показывают, что подкисление извлечения приводит к концентрированию агликонов, а соответственно к значительному увеличению выхода флавоноидов.



состав подвижной фазы:
ацетонитрил – вода в
соотношении 30:70;
температура колонки -
комнатная;
скорость подвижной фазы 0,5
мл/мин;

Рис. 15. Хроматограмма извлечения сосюреи горькой до проведения гидролиза
По оси абсцисс – время удерживания, мин; по оси ординат – высота пика, mAU



состав подвижной
фазы: ацетонитрил –
вода в соотношении
30:70;
температура колонки
- комнатная;
скорость подвижной
фазы 0,5 мл/мин;

Рис. 16. Хроматограмма извлечения сосюреи горькой после проведения гидролиза (пик 2-
лютеолин, $t_R=6,37$)

По оси абсцисс – время удерживания, мин; по оси ординат – высота пика, mAU

Проведенные исследования позволили определить оптимальные условия экстракции для методики количественного определения флавоноидов в траве сосюреи горькой (табл. 26).

Для количественного определения флавоноидов в сырье сосюреи горькой нами разработана методика, основанная на их способности образовывать окрашенный комплекс со спиртовым раствором алюминия хлорида, который вызывает батохромный сдвиг длинноволновой полосы поглощения и при этом в УФ-спектре наблюдается максимум поглощения при длине волны 400 ± 2 нм. Аналогичный максимум поглощения при длине волны 400 ± 2 нм отмечен для

комплекса ГСО лютеолина (Fluka CAS 62696), использованного нами в качестве стандартного образца (рис. 17) [35].

Показания снимали на спектрофотометре ЮНИКО 2802S при длине волны 400 ± 2 нм. Параллельно определяли оптическую плотность комплекса стандартного образца лютеолина с алюминия хлоридом. В качестве раствора сравнения использовали 5 % раствор алюминия хлорида в 90 % спирте этиловом.

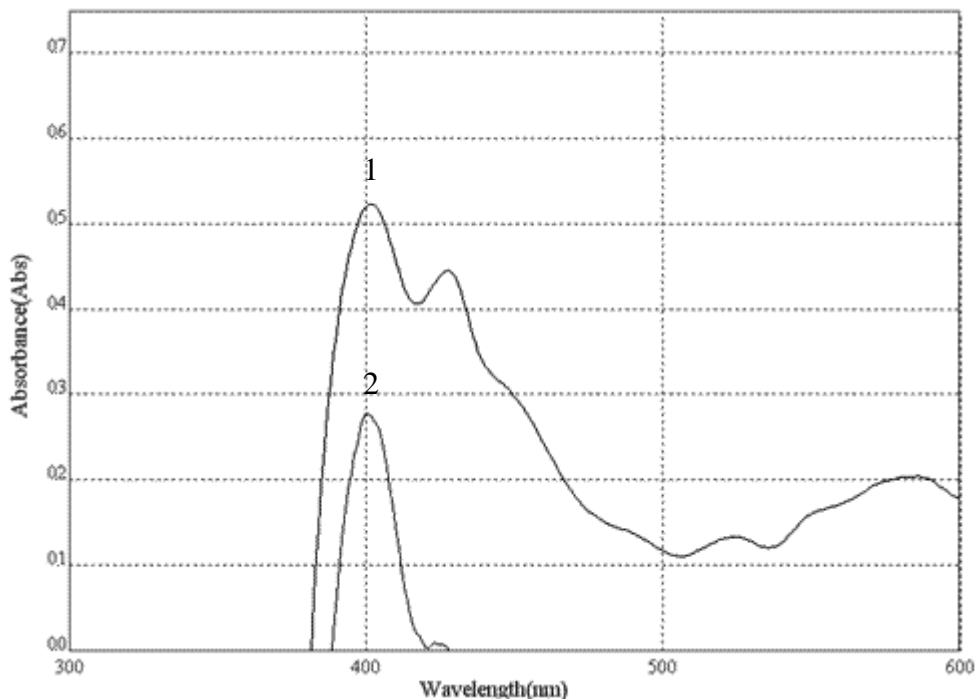


Рис. 17. Спектр (видимая область) гидролизата спиртового извлечения сосюреи горькой (1) и стандартного образца лютеолина (2) после проведения реакции комплексообразования с алюминия хлоридом

По оси абсцисс – длина волны, нм; по оси ординат – оптическая плотность

Влияние условий экстракции на степень извлечения флавоноидов из травы сосюреи горькой

№ образца	Содержание флавоноидов, % от массы абс.-сухого сырья									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Условия экстракции										
Экстрагент этанол, %										
40	1,43	1,61	1,48	1,52	1,34	1,51	1,40	1,53	1,46	1,59
70	2,44	2,50	2,48	2,35	2,38	2,56	2,52	2,41	2,38	2,42
90	2,51	2,46	2,54	2,48	2,51	2,64	2,67	2,40	2,55	2,63
Экстрагент 90% этанол, подкисленный р-ром HCl	2,74	2,69	2,75	2,68	2,79	2,83	2,73	2,67	2,72	2,82
Соотношение сырья и экстрагента										
1:15	1,89	1,72	2,11	1,53	1,50	2,01	1,75	2,03	2,08	2,12
1:30	2,73	2,69	2,74	2,72	2,69	2,83	2,75	2,72	2,68	2,71
1:50	2,61	2,66	2,72	2,58	2,53	2,56	2,76	2,60	2,59	2,63
Измельченность сырья, мм										
1	2,73	2,69	2,74	2,66	2,69	2,78	2,81	2,72	2,73	2,67
3	2,49	2,47	2,53	2,54	2,57	2,40	2,52	2,59	2,48	2,55
5	2,26	2,23	2,10	2,38	2,34	2,32	2,19	2,25	2,28	2,12
Количество экстракций (30 минут)										
Однократная	1,78	1,73	2,10	1,47	1,47	1,80	1,67	1,83	2,07	2,12
Двухкратная	2,60	2,57	2,43	2,56	2,54	2,69	2,72	2,63	2,64	2,43
Трехкратная	2,81	2,69	2,74	2,68	2,68	2,83	2,74	2,72	2,76	2,75
Время экстракции										
15 минут	1,77	1,70	2,11	1,46	1,44	1,83	1,63	1,95	2,09	2,12
30 минут	2,73	2,69	2,67	2,56	2,59	2,83	2,85	2,82	2,73	2,65
45 минут	2,52	2,81	2,63	2,53	2,55	2,51	2,42	2,31	2,62	2,54
60 минут	2,69	2,68	2,71	2,44	2,48	2,86	2,65	2,72	2,59	2,61

Количественное определение. Флавоноиды. Аналитическую пробу сырья травы соснуреи горькой измельчают до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1,0 г измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляют 30 мл 90% спирта, содержащего 1% концентрированной хлористоводородной кислоты, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторяют еще раз указанным выше способом, затем еще 1 раз 90% спиртом в течение 30 мин. Извлечения фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу, промывают фильтр 90% спиртом и доводят объем фильтрата 90% спиртом до метки (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 4 мл раствора А, прибавляют 4 мл 5% раствора алюминия хлорида в 90% спирте и доводят объем раствора 90% спиртом до метки (раствор Б).

Через 20 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 400 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя поглощения 1 см. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 4 мл раствора А, доведенного 90 % спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Стандартный образец лютеолина (Fluka CAS 62696) готовят следующим образом: точную навеску 0,0010 г стандартного образца лютеолина растворяют в 10 мл 90 % этилового спирта в мерной колбе вместимостью 25 мл при нагревании на водяной бане. После охлаждения прибавляют 4 мл 5 % раствора алюминия хлорида в 90 % спирте и доводят объем раствора до метки 90 % спиртом этиловым. Раствор используют свежеприготовленным.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_1 \times a_0 \times 100 \times 25 \times 100 \times 100}{A_0 \times a_1 \times 4 \times 25 \times (100 - W)}, \text{ где}$$

A_1 - оптическая плотность исследуемого раствора;

A_0 - оптическая плотность стандартного раствора лютеолина;

a_0 - масса стандартного образца лютеолина, в г;

a_1 - масса сырья, в г;

W - потеря в массе при высушивании сырья, в %;

100, 4, 25, 25 – объем разведений, в мл.

Результаты анализа образцов сосюреи показали, что содержание флавоноидов в исследуемом сырье составляет $2,74 \pm 0,034$ %. Статистическая обработка результатов количественного определения суммы флавоноидов представлена в таблице 16.

Валидационную оценку разработанной методики количественного определения флавоноидов проводили по показателям: линейность, прецизионность (воспроизводимость) и точность [3, 14, 90, 148].

Для обоснования линейной зависимости предлагаемой методики строили градуировочный график зависимости оптической плотности продукта взаимодействия флавоноидов с алюминия хлоридом от рассчитанной концентрации суммы флавоноидов в траве сосюреи горькой, рассчитывали уравнение регрессии и коэффициент корреляции. Данные для расчетов представлены в табл. 27, графическая зависимость отражена на графике (рис. 18).

Таблица 27

Результаты определения линейности методики количественного определения суммы флавоноидов сосюреи горькой

№ п/п	Навеска сырья, в г	Оптическая плотность	Найденное содержание флавоноидов в навеске сырья, в г
1	0,5011	0,092	0,0139
2	0,6218	0,163	0,0174
3	0,7144	0,207	0,0196

4	0,8020	0,292	0,0221
5	0,9031	0,326	0,0247
6	1,0024	0,420	0,0276
7	1,1140	0,525	0,0304
8	1,2273	0,614	0,0329
9	1,3181	0,712	0,0357
10	1,4064	0,821	0,0386
11	1,5131	0,928	0,0414

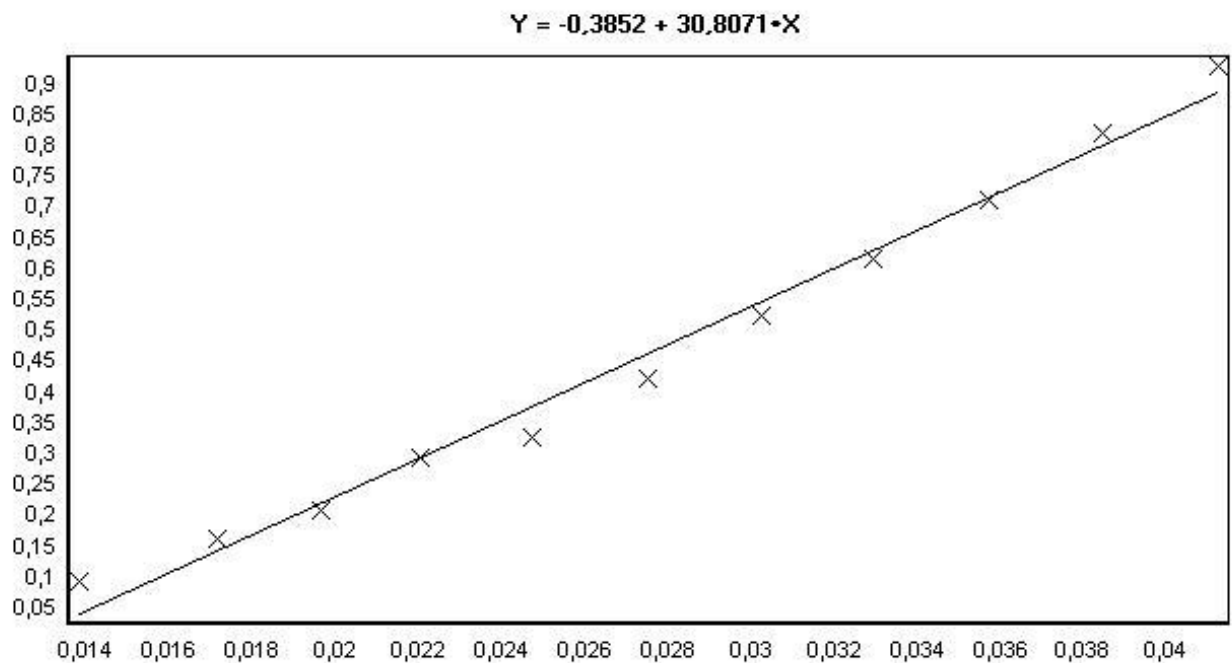


Рис. 18. Градуировочный график зависимости «оптическая плотность – содержание флавоноидов» в траве сосюреи горькой

По оси абсцисс – содержание флавоноидов, г; по оси ординат – оптическая плотность

В результате установлено, что график имеет линейный характер и описывается уравнением $Y=30,807 \cdot X - 0,385$ при содержании флавоноидов в траве сосюреи горькой от 0,0139 до 0,0414 г. Коэффициент корреляции (r) равен 0,993, что свидетельствует о жесткой линейной связи значения оптической плотности от содержания флавоноидов в траве сосюреи горькой. Это позволяет использовать

данную методику для количественного определения флавоноидов в траве сосюреи горькой в данном диапазоне концентраций.

Для установления прецизионности проводили 8 параллельных определений, затем вычисляли величину стандартного отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD) (табл. 28).

Таблица 28

Результаты определения прецизионности методики определения флавоноидов в траве сосюреи горькой

№ п/п	Найденное содержание флавоноидов, %	$(x_i - \bar{x})$	$[(x_i - \bar{x})^2] \times 10^{-4}$	Метрологические характеристики
1	2,76	0,02	4,00	$\bar{x} = 2,74 \%$ $SD = 1,31 \times 10^{-2}$ $RSD = 4,80 \times 10^{-1} \%$
2	2,74	0,00	0,00	
3	2,73	-0,01	1,00	
4	2,75	0,01	1,00	
5	2,74	0,00	0,00	
6	2,72	-0,02	4,00	
7	2,75	0,01	1,00	
8	2,73	-0,01	1,00	

Установлено, что в разработанной методике величина относительного стандартного отклонения менее 5 %, что характеризует надежность анализа в выбранных условиях.

Точность аналитической методики количественного определения подтверждалась на всем диапазоне применения. Оценка проводилась путем сравнения полученного результата с ожидаемым значением.

Для определения точности методики проанализировали 9 образцов травы сосюреи горькой на 3 уровнях концентраций в пределах аналитической области. Для оценки полученных результатов использовали показатель «открываемость»

(R), который, согласно требованиям нормативной документации, должен находиться в пределах $\pm 2\%$ [27].

В результате получены 9 значений открываемости, для которых вычисляли величину стандартного отклонения (SD) и относительного стандартного отклонения (RSD). Результаты представлены в табл. 29.

Таблица 29

Результаты определения точности методики определения флавоноидов в траве
соссюреи горькой

№ п/п	Уровень	Навеска сырья, в г	Найденное содержание флавоноидов, в г	Расчетное содержание флавоноидов, г	Открываемость (R), %	$(R_i - \bar{R})$	$(R_i - \bar{R})^2$	Метрологические характеристики
1	1	0,4951	0,0137	0,0137	100,00	-0,74	0,5476	$\bar{R} = 100,74\%$ SD=0,98 RSD=0,97 %
2	1	0,5013	0,0139	0,0137	101,46	0,72	0,5184	
3	1	0,5022	0,0140	0,0137	102,19	1,45	2,1025	
4	2	1,0031	0,0277	0,0276	100,36	-0,38	0,1444	
5	2	1,0084	0,0279	0,0276	101,09	0,35	0,1225	
6	2	1,1012	0,0281	0,0276	101,81	1,07	1,1449	
7	3	1,5103	0,0411	0,0412	99,76	-0,98	0,9604	
8	3	1,5141	0,0415	0,0412	100,73	-0,01	0,0001	
9	3	1,5072	0,0409	0,0412	99,27	-1,47	2,1609	

Результаты определения точности методики показали, что теоретические и экспериментальные значения количественного содержания флавоноидов в траве соссюреи горькой практически полностью совпадают. Величина относительного стандартного отклонения (RSD) не превышает 5 %, а открываемость $R = 100,74\%$, что характеризует точность методики как удовлетворительную.

Установлено, что предложенная методика количественного определения суммы флавоноидов в траве соссюреи горькой является воспроизводимой и

точной, что предполагает рекомендовать данную методику для контроля качества лекарственного растительного сырья «Соссюреи горькой трава».

В соответствии с проектом ФС «Соссюреи горькой трава», содержание флавоноидов должно быть не менее 2,0 %.

6.4. Определение числовых показателей травы соссюреи горькой

Для оценки качества травы соссюреи горькой нами определены основные числовые показатели по методикам Государственной фармакопеи XI издания. Результаты представлены в проекте ФС. В качестве примесей в растительном сырье рассматриваются части этого же растения, не являющиеся сырьем, части других неядовитых растений (органическая примесь) и минеральная примесь (песок, земля, мелкие камни).

В анализируемых образцах обнаружены примеси корней и прикорневых листьев соссюреи горькой. Содержание подобной примеси не превышало 0,2 %. В проект ФС заложен показатель *другие части растения* не более 0,5 %. В образцах сырья присутствовала минеральная примесь, которая не превышала 0,3 %. Предлагаем внести показатель *минеральной примеси* не более 0,5 %. При проведении анализа органическая примесь составила 0,67 %. В проект ФС предлагаем внести показатель *органической примеси* не более 1,0 %.

Влажность травы соссюреи горькой определяли при температуре 100-105°C, высушивая навески до постоянной массы. Потеря массы сырья при высушивании колебалась от 7,41 % до 8,85 % (табл. 30). Предлагаем внести в нормативную документацию показатель влажности не более 10 %.

При анализе образцов сырья показатель *золы общей* составлял от 6,53 % до 7,87 % (табл. 30). В нормативном документе данный показатель будет составлять не более 10 %.

Содержание *золы, нерастворимой в 10% растворе кислоты хлористоводородной*, определено в незначительных количествах от 0,19 % до 0,42 %, в нормативный документ предлагаем ввести данный показатель не более 1%.

Кроме действующих веществ, для стандартизации травы соссюреи горькой представляло интерес определение содержания *экстрактивных веществ*. Для

этого использовали принятые в технологии получения пищевых и лекарственных экстрактов экстрагенты – воду и спирт этиловый (40 % и 70 %), результаты представлены в табл. 30. Как показывают данные таблицы, наибольшее количество экстрактивных веществ (около 24 %) извлекается водой. При этом 40 % и 70 % этанолом извлекается близкое число экстрактивных веществ около 22 % и 21 % соответственно. В связи с тем, что в дальнейшем предполагается проводить получение экстракционного препарата из травы сосюреи горькой 70 % спиртом этиловым, обладающим противоописторхозным, за счет сесквитерпеновых лактонов, и гепатопротекторным, за счет фенольных соединений, действием, для стандартизации травы сосюреи горькой, предлагаем ввести показатель *содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 70 %-ным этанолом*. В проекте ФС этот показатель будет составлять не менее 20,0 %.

Таблица 30

Итоговые результаты определения числовых показателей травы сосюреи
горькой

№	Показатель, %	№ образца				
		1	2	3	4	5
1	Влажность	7,41	7,97	8,85	8,64	7,94
2	Зола:					
	Зола общая	7,87	6,53	6,81	7,36	7,49
	Зола нерастворимая в 10 % хлористоводородной кислоте	0,35	0,19	0,26	0,42	0,37
3	Примеси:					
	другие части растения	0,18	0,09	0,14	0,21	0,16
	Органическая примесь	0,67	0,65	0,69	0,70	0,64
	Минеральная примесь	0,21	0,14	0,28	0,31	0,19
4	Экстрактивные вещества:					
	-Экстрагент – вода	23,73	24,34	23,57	24,62	24,14
	Экстрагент – 40 % спирт этиловый	21,35	22,20	21,58	21,81	22,04

	Экстрагент – 70 % спирт этиловый	20,54	21,06	20,98	20,76	21,63
--	----------------------------------	-------	-------	-------	-------	-------

Измельченность сырья (результаты ситового анализа). Для определения фракционного состава травы сосюреи горькой (степени его измельченности) нами проведен его ситовой анализ. Для этого использовали набор сит с диаметром отверстий от 0,1 до 7 мм. Как показывают результаты анализа, представленные в табл. 31, трава сосюреи горькой состоит преимущественно из частиц сырья размером 3-6 мм (81 %); на сите с диаметром отверстий 5 мм остается 19,7 % травы сосюреи горькой, 4 мм – 33,2 %, 3 мм – 18,1 %, а 2 мм – 6,3 %. Таким образом, трава сосюреи горькой представляет собой практически однородную по размерам смесь. Содержание частиц, не проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 7 мм, колебалось от 1,08 % до 1,86 %. Предлагаем внести в проект ФС показатель не более 3 %. В проекте ФС регламентируется содержание частиц, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 0,5 мм. Данный показатель варьировал от 2,12 % до 2,86 %. Предлагаем норму данного показателя установить в пределах 3 %.

6.5. Обоснование времени заготовки и сроков хранения сырья

«Сосюреи горькой трава»

Для обоснования времени заготовки травы сосюреи горькой было проведено изучение динамики накопления флавоноидов и сесквитерпеновых лактонов в течение вегетационного периода. Из данных, представленных на рис. 19, следует, что максимальное содержание флавоноидов наблюдается в период массового цветения растения ($2,74 \pm 0,034$ %), что характерно для большинства представителей семейства сложноцветных. При этом содержание сесквитерпеновых лактонов возрастает в фазу бутонизации, максимальное накопление приходится на фазу цветения и постепенно снижается в фазу плодоношения. Полученные результаты согласуются с литературными данными других авторов, изучавших закономерности накопления сесквитерпеновых лактонов в других представителях семейства сложноцветных [48, 99].

Результаты ситового анализа травы сосюреи горькой

№ образца	Частиц травы сосюреи горькой, проходящих сквозь сито с диаметром отверстий мм, %										Частиц травы сосюреи горькой, не проходящих сквозь сито с диаметром отверстий 7 мм, %	
	7	6	5	4	3	2	1	0,5	0,315	0,25		
												1,86
1	1,87	10,46	21,38	32,24	18,73	5,21	3,65	2,26	1,77	0,57		1,09
2	2,26	9,31	19,62	34,15	17,54	6,33	4,94	2,12	1,83	0,81		1,52
3	2,24	9,69	19,56	33,89	17,40	6,37	3,90	2,51	2,18	0,74		1,16
4	2,13	11,56	18,15	32,47	18,54	6,54	3,59	2,86	2,31	0,69		1,08
5	1,94	9,09	19,57	33,18	18,43	6,94	4,74	2,58	1,92	0,53		1,86

Таким образом, на основании полученных данных можно рекомендовать заготовку травы сосюреи горькой с конца фазы бутонизации и до фазы плодоношения, результаты исследования будут использованы при разработке нормативной документации на траву сосюреи горькой, а именно «Инструкция по заготовке, сушке и хранению травы сосюреи горькой» [85].

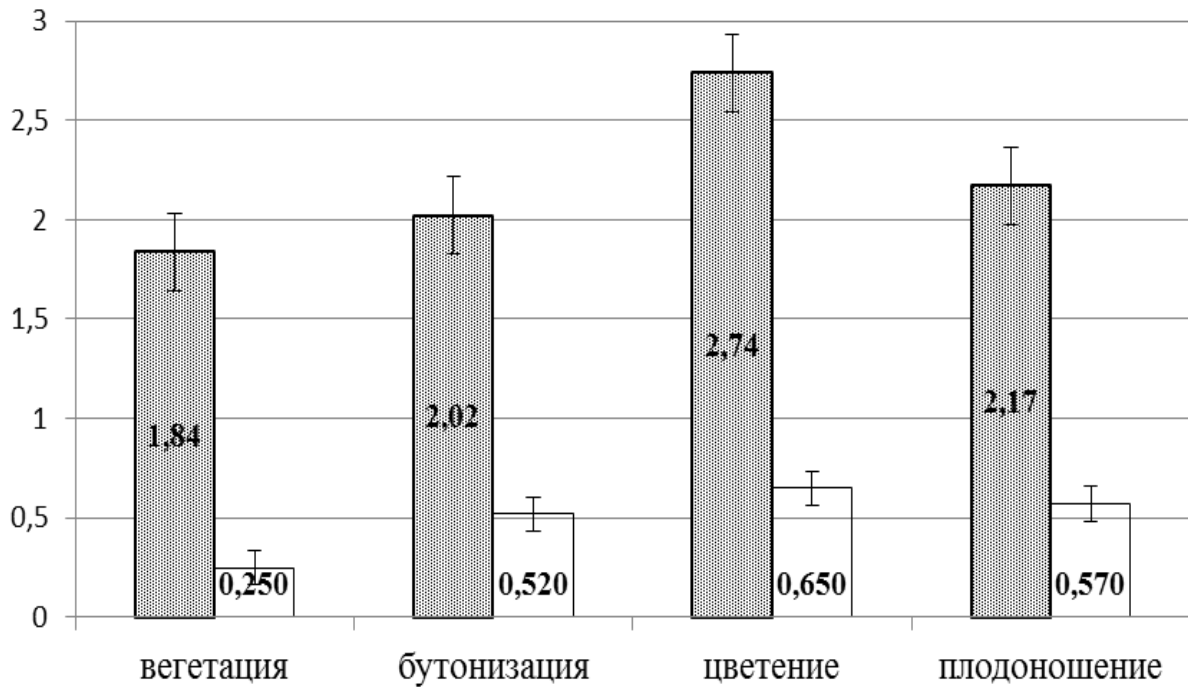


Рис. 19. Сезонная динамика содержания флавоноидов и сесквитерпеновых лактонов в надземной части сосюреи горькой в зависимости от фазы развития (1 – фаза вегетации; 2 – фаза бутонизации; 3 – фаза массового цветения; 4 – фаза плодоношения).

По оси абсцисс – фазы развития сосюреи горькой; по оси ординат – концентрация флавоноидов и сесквитерпеновых лактонов, %.

■ – флавоноиды; □ – сесквитерпеновые лактоны

Для обоснования сроков хранения образцы травы сосюреи горькой закладывали на хранение в соответствии с действующей нормативной документацией ОСТ 42-3-84 «Сырье лекарственное растительное. Порядок установления сроков годности» [75].

Образцы цельного и измельченного лекарственного растительного сырья анализировали в течение 2,5 лет по показателю качества «Количественное определение». Анализ сырья проводили с периодичностью 6 месяцев.

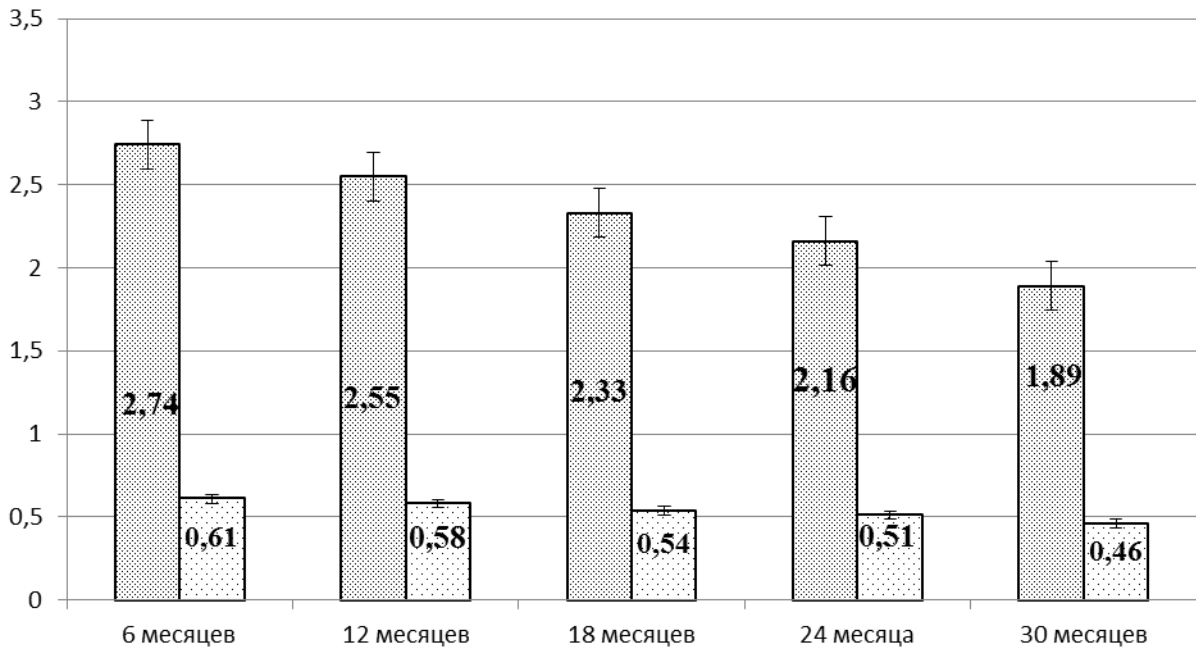


Рис. 20. Результаты изучения сроков годности травы соссюреи горькой.

По оси абсцисс – периодичность анализов; по оси ординат – концентрация флавоноидов и сесквитерпеновых лактонов, %.

■ – флавоноиды; ■ – сесквитерпеновые лактоны

Полученные результаты (Рис. 20) позволяют установить срок годности для цельного и измельченного сырья «Соссюреи горькой трава» – 2 года.

Заключение по экспериментальной части

С использованием современных методов аналитической химии проведен анализ веществ первичного (полисахариды, аминокислоты, аскорбиновая кислота) и вторичного (сесквитерпеновые лактоны, каротиноиды, хлорофиллы, фенолкарбоновые кислоты, кумарины, флавоноиды) обмена надземной части соссюреи горькой. Осуществлена оценка безопасности применения (острая токсичность) и изучена специфическая (противоописторхозная и гепатопротекторная) фармакологическая активность водно-спиртовых извлечений из надземной части соссюреи горькой. Проведена оценка запасов травы соссюреи горькой (на примере Омской области). По результатам проведенного фармакогностического анализа, разработан проект фармакопейной статьи «Соссюреи горькой трава».

ВЫВОДЫ

1. На основании данных литературных источников по распространенности и химико-фармакологической изученности видов рода *Saussurea* DC., встречающейся на территории Сибири, установлено, что наиболее перспективным растением для внедрения в медицинскую практику является соссурея горькая (*Saussurea amara* (L.) DC.)

2. Установлено, что биологически активные соединения надземной части соссуреи горькой представлены: полисахаридами $13,34 \pm 0,15\%$; аминокислотами $0,48 \pm 0,01\%$ (лизин, гистидин, аргинин, треонин, валин, метионин, изолейцин); аскорбиновой кислотой $0,12 \pm 0,03\%$; сесквитерпеновыми лактонами $0,61 \pm 0,02\%$ (цинаропикрин, гроссгемин, репин); каротиноидами $1,60 \pm 0,19\text{ мг}\%$; хлорофиллами (А $15,80 \pm 0,70$ и В $29,3 \pm 0,60\text{ мг}\%$); фенольными соединениями $8,56 \pm 0,12\%$, из них фенолкарбоновыми кислотами и их производными $4,45 \pm 0,16\%$ (хлорогеновая кислота, кофейная кислота, галловая кислота, феруловая кислота, цинарин, сиреневая кислота); флавоноидами $2,74 \pm 0,03\%$ (апигенин, космосиин, лютеолин, цинарозид); кумаринами $0,59 \pm 0,02\%$ (умбеллиферон); дубильными веществами $0,50 \pm 0,04\%$; следы тритерпеновых сапонинов и эфирного масла.

3. В ходе оценки неспецифической токсичности установлено, что этанольные извлечения соссуреи горькой относятся к IV классу опасности (малоопасные вещества). Результаты скрининговых фармакологических исследований извлечений соссуреи горькой показали наличие гепатопротекторной и противоописторхозной активности.

4. Определен объём возможной ежегодной заготовки травы соссуреи горькой (до 40 тонн) на территории Омской области.

5. Определены морфологические и микроскопические диагностические признаки травы соссуреи горькой. Диагностическое значение имеет форма, окраска и строение листьев, стеблей, соцветий, а также особенности обертки корзинок. Микроскопические диагностические признаки заключаются в наличии на эпидермисе листа 3 типов волосков: нитевидных; многоклеточных,

расширенных у места прикрепления и железистых «булавовидных» волосков; встречаются «куполообразные» железки. На эпидермисе трубчатых цветков встречаются два типа трихом: железистые «булавовидные» волоски и крупные волоски, состоящие из многоклеточной ножки и шаровидной головки.

6. Разработаны методики качественного обнаружения и количественного определения флавоноидов (метод ТСХ и метод дифференциальной спектрофотометрии) и сесквитерпеновых лактонов (метод ВЭЖХ) в траве сосюреи горькой, определены числовые показатели травы сосюреи горькой.

7. Разработан проект ФС «Сосюреи горькой трава», составлен проект Инструкции по сбору и сушке травы сосюреи горькой.

Список литературы

1. А.с. 833252 (СССР), М. Кл. А 61 К 35/78 Способ получения флавоноидов / Г.М. Федосеева (СССР). – 4 с.
2. Андреева, В. Ю. Исследование химического состава надземной части манжетки обыкновенной *Alchemilla vulgaris* L. / В. Ю. Андреева, Г. И. Калинкина // Химия растительного сырья. – 2000. – № 2. – С. 79-85.
3. Арзамасцев, А. П. Валидация аналитических методов / А. П. Арзамасцев, Н. П. Садчикова, Ю. Я. Харитонов // Фармация. 2006. – № 4. – С. 4-12.
4. Атлас Омской области. Федеральная служба геодезии и картографии России. М.: 1999. – 56 с.
5. Бандюкова, В. А. Фенолокислоты растений, их эфиры и гликозиды / В. А. Бандюкова // Химия природ, соединений. – 1983. – №3. – С. 263-273.
6. Бассаргин, Д. Д. Флавоноиды некоторых дальневосточных видов сосюрей *Saussurea* DC. (Asteraceae) / Д. Д. Бассаргин // Тез. докл. Всесоюз. научн. конф.: Результаты и перспективы науч. исследований в области создания лекарственных средств из растительного сырья. М. – 1987. – С. 32-33.
7. Белоногова, В. Д. Запасы, рациональное использование и охрана дикорастущих лекарственных растений Пермского края / В. Д. Белоногова, А. В. Курицын, А. Ю. Турышев; под ред. Г. И. Олешко: монография. – Пермь: Тип. ГОУ ВПО «ПГФА Росздрава», 2008. – 235 с.
8. Биологическая активность *Saussurea amara* / Л. Д. Модонова [и др.] // Химико-фармацевт. журн. – 1986. – № 12. – С. 1472-1475.
9. Блинова, К. Ф. К поискам физиологически активных веществ во флоре Забайкалья / К. Ф. Блинова, Р. Е. Пименова, М. Г. Пименов // Вопр. фармакогнозии. – 1967. – Вып.1. – С. 109-119.
10. Бондарчук, Р. А. Исследование фенольных соединений хвоща лесного (*Equisetum sylvaticum* L.) / Р. А. Бондарчук, Н. Э. Коломиец // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – Т. 10, № 5. – С. 25-28.

11. Быструшкина, Е. В. Биохимическое разнообразие горькуш высокогорий Урала / Е. В. Быструшкина, Л. И. Алексеева, А. Г. Быструшкин // *Turczaninowia*. – 2012. – №15 (2). – С. 114–119.
12. Бычков, В. Г. Описторхоз в Обь-Иртышском бассейне (вопросы этиологии и патогенеза) / В. Г. Бычков, Г. Г. Крылов, А. О. Плотников // *Мед. паразитология и паразитар. болезни*. – 2007. – № 4. – С. 3-8.
13. Валидация аналитических методик для производителей лекарств. Типовое руководство предприятия по производству лекарственных средств, подготовленное Федеральным союзом фармпроизводителей Германии (ВАН), пер. Ж. И. Аладышевой, О. Р. Спицкого / Под ред. В. В. Береговых. – М.: Литерра, 2008. – 132 с.
14. Варлаков, М. Н. Избранные труды / М. Н. Варлаков; под. ред. А. Д. Туровой. М., 1963. – 172 с
15. Верещагин, В. И. Полезные растения Западной Сибири / В. И. Верещагин, К. А. Соболевская, А. И. Якубова. – М.; Л.: Наука, 1959. – 348 с.
16. Вершинин, В. И. Планирование и математическая обработка результатов химического эксперимента: уч. пособие / В. И. Вершинин, Н. В. Перцев. Омск : Изд-во ОмГУ, 2005. – 216 с.
17. Вичканова, С. А. Антимикробная активность видов рода *Saussurea* DC. / С. А. Вичканова, М. А. Рубинчик, А. И. Шретер // *Растительные ресурсы*. – 1969. – Т. 5, Вып. 2. – С. 224-229.
18. Вичканова, С. А. Антимикробные препараты растительного происхождения / С. А. Вичканова, М. А. Рубинчик, Т. С. Федорченко // *Фитонциды в народном хозяйстве*. – Киев: Наук. Думка, 1964. – С. 228-231.
19. Волхонская, Т. А. Биологически активные вещества растений рода *соссюрея* / Т. А. Волхонская, И. М. Красноборов, О. И. Фролова // *Лекарственные растения в традиционной и народной медицине*. Улан-Удэ: Бур. кн. изд-во. – 1987. – С. 38-39.
20. Волхонская, Т. А. Обследование растений горного массива Монгун-Тайга и нагорья Сангилен на содержание флавоноидов / Т. А. Волхонская, В. М.

Ханмингун, О. И. Фролова // Растительные ресурсы. – 1983. – Т.19, вып. 4. – С. 454-464.

21. Ворошилов, В. Н. Поиски нового лекарственного растительного сырья / В. Н. Ворошилов М.: Медгиз, 1941. – 256 с.

22. Выделение и анализ природных биологически активных веществ / Е. А. Краснов [и др.]. – Томск: Издательство Томского Университета, 1987. – 184 с.

23. Гаммерман А. Ф. Словарь тибетско-латино-русских названий лекарственного сырья, применяемого в индо-тибетской медицине / А. Ф. Гаммерман, Б. В. Семичов. – Улан-Удэ: БКНИИ СО АН СССР. – 1963. – 179 с.

24. Георгиевский, В. П. Биологически активные вещества лекарственных растений / В. П. Георгиевский, Н. Ф. Комиссаренко, С. Е. Дмитрук. – Новосибирск: Наука, 1990. – 336 с.

25. Георгиевский, В. П. Физико-химические методы анализа биологически активных веществ растительного происхождения / В. П. Георгиевский, Н. А. Казаринов, М. О. Каррыев. – Ашхабад: Илым, 1976. – 239 с.

26. ГОСТ 12.1.007 76. Система стандартов безопасного труда. Вредные вещества. Классификация и общие требования безопасности. – М.: Издательство стандартов, 1976. – 6 с.

27. ГОСТ Р ИСО 5725-2002 «Точность (правильность и прецизионность) методов и результатов измерений» В 6 ч. – Введ. 23.04.02. – М.: Госстандарт России; Изд-во стандартов, 2002.

28. Государственная фармакопея Российской Федерации. XII изд. – ч. 1. – М.: Научный центр экспертизы средств медицинского применения, 2007. – 696 с.

29. Государственная фармакопея СССР. Вып.1. Общие методы анализа / МЗ СССР. 11-е изд., доп. – М: Медицина, 1987. – 336 с.

30. Государственная фармакопея СССР. Вып.2. Общие методы анализа. Лекарственное растительное сырье / МЗ СССР. 11-е изд., доп. – М.: Медицина, 1989. – 400 с.

31. Государственный доклад о санитарно-эпидемиологической обстановке в Российской Федерации в 2012 году [Электронный ресурс]. – Режим доступа:

http://rospotrebnadzor.ru/c/document_library/get_file?uuid=9673664f-01b6-4526-9638-62c095c5da4f&groupId=949409 свободный. – (дата обращения 01.04.2013).

32. Гринкевич, И. Н. Химический анализ лекарственных растений / И. Н. Гринкевич, Л. Н. Сафронович. М.: Высшая школа, 1983. – 176 с.

33. Доркина, Е. Г. Гепатопротекторные свойства флавоноидов (Фармакодинамика и перспективы клинического использования) : автореф. дис. д. б. н. : 14.03.06 / Е. Г. Доркина. – Волгоград, 2010. – 48 с.

34. Дудко, В. В. О сесквитерпеновом лактоне из *Saussurea salicifolia*. / В. В. Дудко, К. С. Рыбалко // Химия природ. соед. – 1982. – № 4. – С. 424-425.

35. Евдокимова, О. В. Разработка и валидация методики количественного определения суммы флавоноидов в траве тысячелистника / О. В. Евдокимова // Вестник ВГУ, Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2007. – №. 2. – С. 155-160.

36. Желнов, И. И. Химические исследования сосюреи горькой / И. И. Желнов, И. М. Садовая // Некоторые вопросы фармакогнозии дикорастущих и культивируемых растений Сибири. Томск, 1969. – С.74-76.

37. Желнов, И. И. Химическое исследование сосюреи широколистной (*Saussurea latifolia* Ledeb.) / И. И. Желнов, А. К. Граждан, С. А. Белобородова // Тр. 1-й науч. Конф. Томск. отд. Всесоюзн. хим. о-ва. – Томск, 1969. – С. 288-290.

38. Запасы сырья лекарственных растений западного Прибайкалья / Е. Г. Худоногова [и др.]. // Вестник Алтайского государственного университета. – 2010. – Т. 73, № 11. – С. 43-47.

39. Инфракрасная спектроскопия органических и природных соединений / А. В. Васильев [и др.]. – СПб.: СПбГЛТА, 2007. – 54 с.

40. Исаев, Д. И. Ресурсы дикорастущих растений Губинского горного массива (Азербайджан) / Д. И. Исаев, Ю. Б. Керимов // Растительные ресурсы. – 2005. – Т. 41, № 1. – С. 82-90.

41. Использование нингидриновой реакции для количественного определения α -аминокислот в различных объектах: Метод. реком. / Сост. А. В. Симонян [и др.]. – Волгоград, 2007. – 106 с.

42. Исследование алкалоидов *Saussurea salsa* и *S. elegans* / А. М. Хашимов [и др.]. // Химия природных соединений. – 1968. – №6. – С.367-370
43. Исследование химического состава лихниса халцедонского, культивируемого в Западной Сибири. Сообщение I. Хроматографическое исследование фенольных соединений / И. М. Смолякова [и др.]. // Химия растительного сырья. – 2010. – №3. – С. 91-94.
44. К изучению свертывающих и противосвертывающих свойств некоторых растений флоры Сибири / Е. С. Шишкина [и др.]. // Исследование лекарственных препаратов природного и синтетического происхождения. – Томск, 1975. – С.90-92.
45. Карпович, В. Н. Предварительное исследование растений, входящих в восточные рецепты, применяемые при сердечно-сосудистых заболеваниях // Сб. науч. тр. института / Ленинградский химико-фармацевтической институт. – Л., 1961. – Т. XII. –С. 195-200.
46. Количественное определение цинаропикрина в сухом экстракте василька шероховатого методом ВЭЖХ / И. П. Каминский [и др.]. // Химико-фармацевтический журнал. – 2011. – Т. 45, № 9. – С. 37-40.
47. Коновалова, О. А. О сесквитерпеновом лактоне из *Saussurea amara* / О. А. Коновалова, К. С. Рыбалко, М. Т. Пименов // Химия природных соед. –1979. – №6. – С. 865-866.
48. Коновалов, Ю. Б. Динамика накопления сесквитерпеновых лактонов в траве полыни австрийской / Ю. Б. Коновалов, Т. Д. Мезенова, Д. А. Коновалов // Фармация. – 2006. – № 6. – С. 9.
49. Конспект флоры Сибири: сосудистые растения / Сост. Л. И. Малышев [и др.]. – Новосибирск: Наука, 2005. – 362 с.
50. Косман, В.М. Количественное экстракционно-спектрофотометрическое определение суммарного содержания гидроксикоричных кислот в присутствии флавоноидов в экстрактивных веществах некоторых лекарственных растений / В. М. Косман, И. Г. Зенкевич // Раст. ресурсы. – 2001. – Вып. 4. – С. 123-129.

51. Красиков, В. Д. Основы планарной хроматографии / В. Д. Красиков. СПб. : Химиздат, 2005. – 232 с.
52. Крылов, Г. В. Зеленая аптека Кузбасса / Г. В. Крылов, Э. В. Степанов. – Кемерово : Кемеровское кн. изд-во, 1975. – 232 с.
53. Куваев, В. Б. Предварительная химическая оценка лекарственных растений тибетской медицины, произрастающих в Забайкалье / В. Б. Куваев, К. Ф. Блинова // Вопр. фармакогнозии. – 1961. – Вып. 1. – С. 213-262.
54. Куркина, А. В. Методика определения суммы флавоноидов в цветках пижмы / А. В. Куркина, А. И. Хусаинова // Фармация. – 2010. – №3. – С. 21-24.
55. Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
56. Лавренко, Н. Н. Среднемасштабная геоботаническая карта Омской области / Н. Н. Лавренко // Сб. «Геоботаническое картографирование». Л.: Наука, 1974. – С. 24-40.
57. Лактоны некоторых видов рода *Saussurea* DC. / К. С. Рыбалко [и др.]. // Растит. ресурсы. – 1976. – Т.12, вып. 3. – С. 387-389.
58. 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.
59. Лекарственные растения Бурятии / А. А. Алексеева [и др.]. – Улан-Удэ: Бур. кн. изд-во, 1974. – 208 с.
60. Липшиц, С. Ю. Род *Saussurea* DC. (Asteraceae) / С. Ю. Липшиц. – Л.: Наука, 1979. – 283 с.
61. Липшиц, С. Ю. Соссюрея, Горькуша. – *Saussurea* DC. / С. Ю. Липшиц, Б.К. Шишкин, Е.Г. Бобров / под ред. акад. В.Л. Комарова / Флора СССР. – М.; Л.: Изд-во АН СССР. – 1962. – Т.27. – С. 361-535.
62. Ложкин, А. В. Природные кумарины: методы выделения и анализа / А. В. Ложкин, Е. И. Саканян // Химико-фармац. журн. – 2006. – Т. 40, № 6. – С.47-55.

63. Макаренко, Н. Г. Антимикробные свойства лекарственных растений Горного Алтая / Н. Г. Макаренко: дис. канд. биол. наук. Новосибирск, 1974. – 195 с.
64. Массажетов, П. С. Поиск алкалоидоносных растений в Средней Азии/ П. С. Массажетов // Тр. Всесоюз. ин-та лекарств, и аромат, растений. – 1947. – Вып. 9. – С. 3-38.
65. Медик, В. А. Руководство по статистике в медицине и биологии. В 2-х томах / В. А. Медик, М. С. Токмачев, Б. Б, Фишман / Под ред. проф. Ю. М. Комарова. Т. 1. Теоретическая статистика. – М.: Медицина, 2000. – 412 с.
66. Методы исследования углеводов / Пер. с англ. В.А. Несмеянова; под ред. А.А. Харлина. М.: «Мир», 1975. – 445 с.
67. Минина, С. А. Химия и технология фитопрепаратов : учеб. пособие / С. А. Минина. 2-е изд., перераб. и доп. – М. : ГЭОТАР-Медиа; 2009. – 560 с.
68. Молокова, О. А. Патоморфология печени при лечении празиквантелом / О. А. Молокова, В. Е. Ярославский // Медицинская паразитология. – 1993. – №4. – С. 53.
69. Нежевняк, О. В. Агрэкологическое районирование Омской области / О. В. Нежевняк, Я. Р. Рейнгард // Омский научный вестник. – 2006. – № 5. – С. 135-138.
70. Никифиров, Л. А. Изучение аминокислотного состава ряски малой (*Lemna minor* L.) / Л. А. Никифиров, М. В. Белоусов, Н. С. Фурса // Бюллетень сибирской медицины. – 2011. – Т.10, № 5. – С. 74-77.
71. Никольская, Н. И. Закономерности в распределении растительности солончаков на территории степной и пустынной областей в пределах СССР / Н. И. Никольская // Ботанический журнал. – 1985. – Т. 70, № 3. – С. 332-340.
72. О противомикробном действии *Saussurea amara* / Л. Д. Модонова [и др.]. // Проблемы освоения лекарственных ресурсов Сибири и Дальнего Востока. – Новосибирск, 1983. – С. 208.
73. Олейников, Д. Н. Методика количественного определения суммарного содержания полисахаридов в семенах льна (*Linum usitatissimum* L.) / Д. Н.

Олейников, Л. М. Танхаева // Химия растительного сырья. – 2007. – № 4. – С. 85-90.

74. ОСТ 42 -506 96. Стандарт отрасли. Порядок разработки, согласования и утверждения нормативной документации на лекарственные средства и лекарственное растительное сырье. – М., 1996. – 49 с.

75. ОСТ 42-3-84. Лекарственные средства. Порядок установления сроков, годности. – М.: Издательство стандартов, 1984. – 48 с.

76. ОСТ 91.500.05.001-00. Стандарты качества лекарственных средств. Основные положения. – М., 2000. – 65 с.

77. ОФС 42-0013-03. Правила приемки лекарственного растительного сырья и методы отбора проб / Гос. инспекция за качеством лекарств, средств и изделий мед. техники, Взамен ГФ XI, вып 1, стр. 267; Введ. 16.06.2003 до 16.06.2008. – Б.м., [б.г.] - 15 с.

78. Оценка антиоксидантной и антитоксической эффективности природного флавоноида дигидрокверцетина / Л.В. Кравченко [и др.]. // Токсикол. вестник. – 2005. – № 1. – С. 14-20.

79. Патоморфологические изменения в печени и лимфоидных органах золотистых хомяков, зараженных описторхисами, при лечении их празиквантелом / Д. Г. Баяндина [и др.]. // Мед. паразитол. и паразитарн. болезни. – 1987. – №5. – С.37-41.

80. Пестов, Б. М. Материалы к фармакологии общего действия и токсичности экстракта сосюреи двуцветной / Б. М. Пестов // Лекарственные и сырьевые ресурсы Иркутской обл. – Иркутск. – 1965. – Вып. 4. – С. 165-167.

81. Пименова, М. Е. Изучение ресурсно-фитохимических ценопопуляций тысячелистника обыкновенного (*Achillea millefolium* L.) / М. Е. Пименова Д. А. Коновалов, Т. А. Нестерова // Вестник ВГУ. Серия: Химия. Биология. Фармация. – 2003. – № 2. – С. 225-227.

82. Полуэктова, Т. В. Хроматографическое исследование изофлавоноидов климактерического сбора /Т. В. Полуэктова, Н. Э. Коломиец, Г. И. Калинкина // Химия растительного сырья. – 2011. – №2. – С. 141-144.

83. Постников, Б. А. К изучению биологических и морфологических особенностей сибирских видов рода *Saussurea* DC. / Б. А. Постников // Комплексное изучение полезных растений Сибири. – Новосибирск: Наука, 1974. – С.56-61.

84. Постников, Б. А. Фитохимическое изучение сибирских видов рода *Saussurea* DC. / Б. А. Постников // Комплексное изучение полезных растений Сибири. – Новосибирск: Наука, 1974. – С.157-162.

85. Правила сбора и сушки лекарственных растений: сборник инструкций / под ред. А.И. Шретера. – М.: Медицина, 1985. – 328 с.

86. Практикум по фармакогнозии: Учеб. пособие для студ. вузов / В. Н. Ковалев [и др.]; Под общ. ред. В.Н. Ковалева. – Харьков: Изд-во НфаУ: Золотые страницы: МТК-Книга, 2004. – 512 с.: 615 ил.: 24 с. вкл.

87. Приказ МЗ СССР № 1045-73 от 6.04.1973 г. «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально биологических клиник (вивариев)».

88. Природные флавоноиды / Д. Ю. Корулькин [и др.]. Рос. акад. наук, Сиб. отд-ние, Новосиб. ин-т фитохимии. – Новосибирск: Гео, 2007. – 232 с.

89. Противоописторхозное действие экстракта сосюреи солончаковой / А. И. Драб [и др.]. // Химико-фармацевт. журн. – 2005. – Т.39, №8. – С. 30-32.

90. Путенихин, В. П. Ценопопуляция можжевельника казацкого (*Juniperus sabina* L.) на хребте Ирендык в Башкирском Зауралье / В. П. Путенихин, Г. Г. Фарукшина // Вестник ОГУ. – 2009. – №6. – С. 301-303.

91. Ракшаина, М. Ц. Перспективные растения с антимикробными свойствами: По материалам исследования тибетского труда “Лхантаб” / М. Ц. Ракшаина / АН СССР, Сиб. отд-ние, Бурят. науч. центр. – Улан-Удэ, 1988. – 59 с.

92. Растительные ресурсы СССР: Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейство Asteraceae (Compositae) / под ред. П. Д. Соколова. – СПб. : Наука, 1993. – 352 с.

93. Ревина, Т. А. Экдистероидсодержащие виды во флоре Горного Алтая / Т. А. Ревина, А. С. Ревушкин, А. В. Ракитин // Растительные ресурсы. – 1988. – Вып. 4. – С.565-570.
94. Рубинчик, М. А. К вопросу об антипротозойных свойствах нового сесквитерпенового лактона саурина. / М. А. Рубинчик, С. А. Вичканова // Фитонциды: Биологическое значение, свойства и применение. – Киев, 1973. – С.65-66.
95. Рубинчик, М. А. Противоамебные свойства некоторых высших растений / М. А. Рубинчик, С. А. Вичканова, А. И. Шретер // Растительные ресурсы. – 1971. – Т.7, Вып. 1. – С 80-85.
96. Руководство по валидации методик анализа лекарственных средств / под ред. Н. В. Юргеля [и др.]; Разработчики В. Л. Багирова [и др.]. – М.: Фармацевтическая промышленность, 2007. – 58 с.
97. Руководство по стандартизации лекарственных средств / Под ред. Р. У. Хабриева, В.Л. Багировой, В.Б. Герасимова. – М.: Медицина, 2006. – 352 с.
98. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общ. ред. Р.У. Хабриева. 2-изд., перераб. и доп. – М.: ОАО Изд-во Медицина, 2005. – 832 с.
99. Рыбалко, К. С Природные сесквитерпеновые лактоны / К. С. Рыбалко. – М.: Медицина, 1978. – 320 с.
100. Саратиков, А. С. Экстракт голубушки как противоямблиозное средство. / А. С. Саратиков, В. Е. Федотова // Аптечное дело. – 1962. – №3. – С. 26-28.
101. Сергиевская, Л. П. Материалы к изучению народных лекарственных растений Забайкалья / Л. П. Сергиевская. М.: 1940. – 16 с.
102. Серых, Г.И. *Saussurea* DC. – Соссюрея, Горькуша. / Г. И. Серых, О. С. Жирова, И. М. Красноборов / Флора Сибири. Т.13: Asteraceae (Compositae). – Новосибирск: Наука. – 1997. – С. 180-209.

103. Сильверстейн Р. Спектрометрическая идентификация органических соединений / Р. Сильверстейн, Ф. Вебстер, Д. Кимл. – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. – 557 с.
104. Смагунова, А. Н. Методы математической статистики в аналитической химии / А. Н. Смагунова, О. М. Карпукова. Ростов-на-Дону: Феникс, 2012. – 352 с.
105. Соколова, С. Н. Изучение химического состава и биологической активности *Saussurea controversa* / С. Н. Соколова // Матер. 70-й Юбилейной итоговой науч. студ. конф. им. Н.И. Пирогова. – Томск, 2011. – С. 233.
106. Сосков, Ю. Д. Новые алкалоидоносы из флоры Средней Азии и Казахстана / Ю. Д. Сосков, Х. Х. Убаев, Т. Н. Смирнова // Изв. АН ТаджССР. Биол. науки. – 1963. – Вып. 1. – С.45-57
107. Спектрофотометрический метод определения содержания каротинов, ксантофиллов и хлорофиллов в экстрактах семян растений / О. В. Булда [и др.]. // Физиология растений. – 2008. – Т.55, № 4 – С. 604-611.
108. Спектрофотометрическое определение гидроксикоричной кислоты и ее производных в препаратах эхинацеи / О. А. Запорожец [и др.]. // Химико-фармацевтический журнал. – 2003. – Т.37, № 12. – С.11-14.
109. Спектрофотометрическое определение флавоноидов в растительном сырье / А. В. Булатов [и др.]. // Аналитика и контроль. – 2012. – Т. 16, №4. – С. 358-362.
110. Справочник по ботанической микротехнике. Основы и методы / Р. П. Барыкина [и др.]. – М.: Изд-во МГУ, 2004. – 312 с.
111. Средство на основе растений рода *Saussurea* ДС, обладающее гепатопротекторным действием : пат. 2464036 Рос. Федерация : МПК⁷ А61К 36/28, А61Р 1/16 / Нурмухаметова К.А. ; заявитель и патентообладатель ООО «Нурофит». – № 2011105238/15 ; заявл. 14.02.2011 ; опубл. 20.10.2012 Бюл. № 29. – 8 с.
112. Стратегия ВОЗ в области народной медицины 2002-2005гг. ВОЗ, Женева, 2002, 62 с.

113. Телятьев, В. В. Полезные растения Центральной Сибири / В. В. Телятьев / Иркутск: Восточно-Сибирское книжное изд-во, 1987. – 400 с.
114. Федорова, В. С. Соотношение содержания аскорбиновой кислоты и флавоновых веществ в дикорастущих растениях Алтая / В. С. Федорова // Растительные ресурсы Сибири, Урала и Дальнего Востока. – Новосибирск, 1965. – С. 70-73.
115. Федосеева, Л. М. Установление технологических параметров листьев лопуха большого / Л. М. Федосеева, М. А. Биндюк // Химия растительного сырья. – 2008. – № 1. – С. 149-150.
116. Химико-фармакологическое исследование растений рода сосюрея / К. А. Нурмухаметова [и др.]. // Бюллетень сибирской медицины. – 2004. – Т. 3, № 4. – С. 67-70.
117. Химический состав и возможности использования в медицине некоторых растений флоры Сибири / Е. А. Краснов [и др.]. // Тезисы докладов Всесоюзной научной конф.: Результаты и перспективы науч. исследований в области создания лекарственных средств из растительного сырья. – М., 1985. – С. 141-142.
118. Химический состав растений рода сосюрея (*Saussurea*). / В. В. Дудко [и др.]. // Новые лекар. препараты из растений Сибири и Д. Востока. – Томск, 1986. – С. 55-56.
119. Цыдендамбаев, П. Б. Биологические эффекты флавоноидов / П. Б. Цыдендамбаев, Б. С. Хышиктуев, С. М. Николаев // Бюллетень ВСНЦ СО РАМН. – 2006. – №6. – С. 229-233.
120. Эпштейн, Н. А. Оценка пригодности (валидация) ВЭЖХ методик в фармацевтическом анализе (обзор) / Н. А. Эпштейн // Хим.-фарм. журн. – 2004. – Т. 38, № 4. – С. 40-56.
121. Этическая экспертиза биомедицинских исследований. Практические рекомендации / Под общей редакцией Ю. Б. Белоусов. М., 2005. – 156 с.
122. Юнусов, С. Ю. Исследование алкалоидов *Saussurea salsa* и *S. elegans* / С. Ю. Юнусов // Химия природных соединений. – 1968. – №6. – С.367-370.

123. A New Sesquiterpene from *Saussurea parviflora* / Z. D. Yang [et al.] // Chinese Chemical Letters. – 2002. – Vol. 13, № 8. – p. 752-753.
124. American Herbal Pharmacopoeia: botanical pharmacognosy-microscopic characterization of botanical medicines. – CRC Press Inc., 2011. – 733 p.
125. Analytical separation and detection methods for flavonoids / E. de Rijke [et al.] // J. Chromatogr. A. – 2006. – Vol. 1112, Issues 1–2. – P. 31-63.
126. Anticancer Activity of Lignan from the Aerial Parts of *Saussurea salicifolia* (L.) DC./ G. Chunsriimyatav [et al.]// Czech J. Food Sci. – 2009. – Vol. 27. – P. 256-258.
127. Anti-cancer potential of sesquiterpene lactones: bioactivity and molecular mechanisms / Zhang S. [et al.] // Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents. – 2005. – T. 5. – №. 3. – C. 239-249.
128. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms / Kim H. P. [et al.] // Journal of pharmacological sciences. – 2004. – T. 96. – №. 3. – C. 229-245
129. Bolhmann, F. Isolierung der Acetylenverbindungen aus *Saussurea pectinata* Bunge / F. Bolhmann, C. Zdero // Chem. Ber. – 1967. – Jg. 100, H.6. – S. 1910-1914.
130. Braune, W. Pflanzenanatomisches Praktikum: zur Einführung in die Anatomie der Vegetationsorgane der höheren Pflanzen / von Wolfram Braune, Alfred Leman, Hans Taubert. – 2., überarb. Aufl. – Jena : G. Fischer VEB, 1971. – 331 S.
131. Chen, Hung-Ju Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Coupled with a Post-Column Derivatization Technique / Hung-Ju Chen, Baskaran Stephen Inbaraj, Bing-Huei Chen // Int. J. Mol. Sci. – 2012. – Vol. 13. – S. 260-285.
132. Contraceptive properties of *Saussurea salsa* extract / A. I. Drab [et al.] // Pharmaceutical Chemistry Journal. – 2006. – Vol. 40, Number 4. – P. 202-205.
133. Determination of Phenolic Compounds in *Saussurea salicifolia* (L.) DC. by HPLC / G. Chunsriimyatav [et al.] // Czech J. Food Sci. – 2009. – Vol. 27. – P. 259-261.
134. Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers: results from an in vitro and a dietary supplement study / Janssen K. [et

- al.] //The American journal of clinical nutrition. – 1998. – Т. 67. – №. 2. – С. 255-262.
135. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid / Dos Santos M. D. [et al.] //Biological and pharmaceutical bulletin. – 2006. – Т. 29. – №. 11. – С. 2236-2240.
136. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease / García-Lafuente A. [et al.] // Inflammation Research. – 2009. – Т. 58. – №. 9. – С. 537-552.
137. Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications / M. O. Andersen, K. R. Markham. CRC Press, 2006. – 1237 p.
138. Flora baicalensi-dahurica [Электронный ресурс] / N. Turszaninow / 1838-1855. – Т. 1-2 – Режим доступа: <http://www.biodiversitylibrary.org/item/29365#page/330/mode/1up> (дата обращения 05.04.2013).
139. Flora of British India [Электронный ресурс]/ Ed. J. D. Hooker. – L., 1872-1897. – Vol. 1-7. – Режим доступа: <http://www.botanicus.org/title/b11816351> (дата обращения 05.04.2013).
140. Flora Sibirica sive historia plantarum Sibiriae [Электронный ресурс] / Johann Georg Gmelin / 1749. – Режим доступа: <http://books.google.ru/books?id=qgcYAAAAYAAJ&printsec=frontcover&hl=ru#v=onepage&q&f=false> (дата обращения 05.04.2013).
141. Fraga, B. M. Natural sesquiterpenoids / B. M. Fraga // Natur. Prod. Repts. – 2005. – Vol. 22. – P.465-486.
142. Futher quainolides from *Saussurea* species / F. Bolhmann [et al.] // Planta med. – 1985. – V.1 – P.74-75.
143. Glasl, S. Choloretic Effects of the Mongolian Medicinal Plant *Saussurea amara* in the Isolated Perfused Rat Liver / S. Glasl, D. Tsendayush, U. Batchimeg // Planta Med. – 2007. – Vol. 73. – P. 59-66.
144. Grotewold, E. The science of flavonoids / E. Grotewold. – Ohio: Springer science and Business Media, 2006. – 274 p.

145. Grushetsky, R. Comparative analysis of different methods of inulin isolation / R. Grushetsky // *Carbohydrates*. – 2004. – Vol. 7. – P. 8-13.
146. High performance liquid chromatography in phytochemical analysis. Chromatographic science series. Vol. 102 / edited by M. Waksmundska-Hajnos, J. Sherma. – New York, CRC Press, 2011. – 998 p.
147. Holme, D. The occurrence of 2-trans, 8-trans deca-2, 8-diene-4, 6-diyn-1-ol – trans, trans-matricarianol in nature/ D. Holme, N.A. Surenson // *Acta Chem Scand*. – 1954. – Vol. 8, № 1. – P.34-41.
148. Huber, L. Validation of analytical Methods: Review and Strategy, LC-GC 1997-1, Version February 21 / L. Huber // *BioPharm*. – 1999. – Vol. 12. – P.64-66.
149. Huneck, S. Inhaltsstoffe weiterer Compositen aus der Mongolei / S. Huneck, H.D. Knapp // *Pharmazie*. – 1986. – Vol.41. – S.673.
150. Influence of pure substance from *Saussurea amara* (L.) DC on experimental bile flow. / D. Tsendayush [et al.] // *The 7th Mongolian-Russian International Medical Symposium. Abstracts*. – Mongolia. – 2006. – p. 41-45
151. Jorge, F. S. Ferreira In vitro trematocidal effects of crude alcoholic extracts of *Artemisia annua*, *A. absinthium*, *Asimina triloba*, and *Fumaria officinalis* / F. S. Ferreira Jorge, P. Peadar, Jennifer Keiser // *Parasitology Research*. – 2011. – Vol. 109, Issue 6. – P. 1585-1592.
152. Khaidav, T. S. Medicinal plants of Mongolian medicine. / T. S. Khaidav, B. Altanchimeg, T. S. Varlamova / 2nd ed. Ulaanbaatar: Mongolia, 1985. – p. 137–138.
153. Kitamura, S. Additional report: results of the Kyoto University scientific expedition to the Karakoram and Hindukush [Электронный ресурс] / S. Kitamura, R. Yosii / 1955. – Kyoto, 1966. <http://seaweedafrica.org/pdf/56286702079852E90Bss02C161B5/44477.pdf> (дата обращения 10.04.2013).
154. Mabry, T. J. The systematic identification of flavonoids / T. J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas. – New York-Heidelberg-Berlin, 1970. – 354 p.

155. Murray, R. D. H. The Naturally Occurring Coumarins. Progress in the Chemistry of Organic Natural Products / R. D. H. Murray Springer – Verlag. – Wien, 2002. – V. 83. 673 p.
156. Phytochemical investigation of the Mongolian medicinal plant *Saussurea amara* (L.) DC (Asteraceae) / S. Glasl [et al.] // 54th Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant Research; 29.8.-2.9.2006, Helsinki.Planta Med. – 2006; 72: 1000. – P.56.
157. Picman, A. K. Biological activities of sesquiterpene lactones / A. K. Picman // Biochemical Systematics and Ecology. – 1986. – T. 14. – №. 3. – С. 255-281.
158. Quantitative HPLC determination of phenolic compounds in yarrow / R. Benetis [et al.] // Pharmaceutical chemistry journal. – 2008. – Vol. 42, №3. – P. 153-156.
159. Report of the AVMA Panel on Euthanasia. // JAVMA 2001 [Электронный ресурс] Vol. 218, No. 5 p. 669-696 Режим доступа: <http://www.research.ucf.edu/Compliance/pdf/EUTHA~17.PDF> (дата обращения 05.04.2013).
160. Rodriguez, E. Biological activities of sesquiterpene lactones / E. Rodriguez, G. H. N. Towers, J. C. Mitchell // Phytochemistry. – 1976. – T. 15. – №. 11. – С. 1573-1580.
161. Sesquiterpene lactones and the diterpene 5-epi-icetexone affect the intracellular and extracellular stages of *Trypanosoma cruzi* / E. Lozano [et al.] // Parasitology International. – 2012. – Vol. 61, Issue 4. – P. 628-633.
162. Simultaneous Determination of Ergolide and 8-epi-confertin in Flowers of *Inula Hupehensis* by HPLC-RP Method / Li Xiaobo [et al.] // 2011 International Conference on Agricultural and Natural Resources Engineering Advances in Biomedical Engineering. – Vol.3-5. – P. 168-173.
163. Simultaneous Quantification of Six Sesquiterpene Lactones in *Inula britannica* L. by RP-LC / Shi Xiao-Wei [et al.] // Chromatographia. – 2008. – Vol. 68, Issue 3-4. – P. 281-285.

164. *Species plantarum* [Электронный ресурс] / Carolus Linnaeus / 1753. – Режим доступа: <http://manybooks.net/titles/linnaeusc2077120771-8.html> (дата обращения 05.04.2013).
165. Suttie, J. W. Vitamin K / J. W. Suttie. / *Fat-soluble vitamins: their biochemistry and applications*. – London, Heinemann, 1985. – С. 225-311.
166. The chemical composition of the extractive substances of *Saussurea controversa* / A. I. Syrchina [et al.] // *Chemistry of Natural Compounds*. – 1993. – Vol. 29, Number 5. – P. 686-687.
167. The Chemopreventive Effects of *Saussurea salicifolia* through Induction of Apoptosis and Phase II Detoxification Enzyme / K. Kang [et al.] // *Biological & Pharmaceutical Bulletin*. – 2007. – Vol 30, № 12. – S.2352-2359
168. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer / E. Middleton, Jr. [et al.] // *Pharmacol. Rev.* – 2000. – Vol. 52, № 4. – P. 673-751.
169. *The Japanese Pharmacopoeia* / Society of Japanese Pharmacopoeia. 15 the edition. – London, 2007. – 1788 p.
170. Validation of analytical procedures: methodology Q2B / Intern, conf. on harmonization of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use. – Geneva : ICH Secretariat, 1996. – 8 p.
171. Wagner, H. *Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas* / H. Wagner, S. Bladt. – New York: Springer, 2001. – 384 p.
172. Warksmundzka-Hajnos, M. *Thin-Layer Chromatography in Phytochemistry* / M. Warksmundzka-Hajnos, J. Sherma, T. Kowalska. – Boca Raton: CRC Press, 2008. – 686 с.
173. Yang, Z. D. Eudesmane derivatives and other constituents from *Saussurea parviflora*. / Z. D. Yang, K. Gao, Z.-J. Jia // *Phytochemistry*. – 2003. – Vol. 62, N 8. – P. 1195-1199.

ПРИЛОЖЕНИЯ

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

УТВЕРЖДАЮ

_____ Ф.И.О.

"__" _____ г.

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ СТАНДАРТ КАЧЕСТВА

ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА

ПРОЕКТ ФАРМАКОПЕЙНОЙ СТАТЬИ

Herba Saussureae amarae

ФС 42-XXXX-XX

Соссюреи горькой трава**Вводится впервые**

Срок введения установлен

«__» _____ 20__ года

Срок действия до

«__» _____ 20__ года

Настоящая фармакопейная статья распространяется на собранную в фазу цветения и высушенную траву дикорастущего многолетнего травянистого растения соссюреи горькой – *Saussurea amara* (L.) DC., сем. астровых – *Asteraceae*, цельную или измельченную и расфасованную в пачки и применяемую в качестве лекарственного средства.

ИЗДАНИЕ ОФИЦИАЛЬНОЕ**ПЕРЕПЕЧАТКА ВОСПРЕЩЕНА**

ФС 42-_____с.2

Трава сосюреи горькой

Показатели качества	Методы испытания	Нормы
1	2	3
<i>Внешние признаки</i>	Визуальный (с помощью стереомикроскопа или лупы), органолептический, ГФ XI	Соответствует ФС
<i>Микроскопия</i>	ГФ XI, вып. 1	Соответствует ФС
<i>Качественные реакции</i>	ВЭЖХ ТСХ	$t_R=11,25$ мин (сесквитерпеновые лактоны) $R_f=0,6$ (флавоноиды)
<i>Числовые показатели:</i> Содержание суммы сесквитерпеновых лактонов в пересчете на цинаропикрин Содержание флавоноидов в пересчете на лютеолин Содержание экстрактивных веществ, извлекаемых 70%-ным этанолом Влажность	Метод ВЭЖХ спектрофотометрия ГФ XI, вып. 1 ГФ XI, вып. 1	Не менее 0,5 % Не менее 2,0 % Не менее 20,0 % Не более 10,0 %

Зола общей	ГФ XI, вып. 1	Не более 10,0 %
Зола, нерастворимой в 10 % растворе кислоты хлористоводородной	ГФ XI, вып. 1	Не более 3,0 %
Других частей растения	ГФ XI, вып. 1	Не более 0,5 %
Органическая примесь	ГФ XI, вып. 1	Не более 0,5%;
Минеральная примесь	ГФ XI, вып. 1	Не более 0,5%.
<i>Микробиологическая чистота</i>	ГФ XI, вып. 2, с. 193	Изменение № 3 категория 5.2
<i>Упаковка</i>		Цельное сырье упаковывается по 15 кг в мешки бумажные многослойные; в мешки полипропиленовые из пропилена окрашенного; по 20 кг в мешки тканевые продуктовые.
<i>Маркировка</i>		Соответствует ФС
<i>Транспортирование</i>		
<i>Хранение</i>		В сухом прохладном, защищенном от света месте
<i>Срок годности</i>		2 года

Внешние признаки. *Цельное сырье* Смесь цельных или частично измельченных олиственных побегов длиной до 30 см. Стебли округлые ребристые, шероховатые, голые. Листья короткочерешковые или сидячие, иногда немного низбегающие, цельнокрайние 2-10 см длины, 0,15-1,5см ширины. Корзинки колокольчатые 1,5-3,0 см шириной в виде щитковидного соцветия.

Обертки черепитчатые, коротко-волосистые или слегка паутинистые. Наружные листочки их короткие, ланцетные, острые или на верхушке зубчатые, средние – на верхушке расширенные в округлые, пленчатые, по краям зазубренные, придатки розового цвета; самые внутренние листочки узкие, почти без придатков. Цветоложе густопленчатое; пленки линейно-шиловидные, блестящие, неравные, до 7 мм длиной. Цветы фиолетово-розовые, пыльники белые. Придатки пыльников коротко и слабо волосистые. Цвет стеблей и листьев серовато-зеленый, запах своеобразный ароматный, вкус водного извлечения горький.

Измельченное сырье. Кусочки корзинок, отдельных цветков, листьев, стеблей различной формы, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм. Цвет серовато-зеленый с фиолетово-розовыми вкраплениями. Запах своеобразный ароматный, вкус водного извлечения горький.

Порошок. Порошок травы серовато-зеленого цвета с фиолетово-розовыми вкраплениями, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм. Запах своеобразный ароматный, вкус водного извлечения горький.

Микроскопия. При рассмотрении микропрепаратов с поверхности листа видны клетки эпидермиса, многоугольные прямостенные, некоторые со слабо волнистым контуром. Кутикула с ясно выраженной лучисто-морщинистой складчатостью хорошо выражена на верхней эпидерме. На нижней эпидерме кутикула гладкая.

Устьица аномоцитного устьичного типа преобладают они на нижней стороне. Волоски простые и железистые 3-х типов: нитевидные, многоклеточно-прямые и изогнутые, тупо-верхушечные, состоящие из 2-6 клеток; многоклеточные, расширенные у места прикрепления и железистые «булавовидные» волоски, состоящие из одной-двух клеток в основании и многоклеточной овальной головки, заполненной желтовато-коричневым содержимым. Железки куполообразного строения, на месте прикрепления образуют розетку (рис. 1).

Эпидермис листочков обертки состоит из веретенообразных клеток с ровными стенками. На эпидермисе, особенно у места прикрепления много

сосочковидных островерхущечных выростов. Кроме того, по краям видны простые многоклеточные тонкостенные волоски (рис. 2).

При рассмотрении трубчатых цветков с поверхности видны клетки, стенки которых изменяются от ровных до сильноизвилистых.

На венчика встречаются два типа трихом: железистые «булавовидные» волоски и крупные волоски, состоящие из многоклеточной ножки и шаровидной головки (рис. 3).

Качественные реакции. *Сесквитерпеновые лактоны.* На хроматограмме испытуемого раствора (см. раздел «Количественное определение») время удерживания основного пика цинаропикрина должно совпадать со временем удерживания пика на хроматограмме РСО цинаропикрина и составлять около 11,25 мин.

Флавоноиды. Аналитическую пробу сырья травы сосюреи горькой измельчают до величины частиц проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1,0 г сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 30 мл 70 % этанола, нагревают на кипящей водяной бане с обратным холодильником 10 мин. После охлаждения полеченное извлечение фильтруют через бумажный фильтр.

На линию старта хроматографической пластинки «Сорбфил» размером 10×10 см в виде точки микропипеткой 0,02 мл полученного раствора и 0,02 раствора ГСО лютеолин-7-глюкозида. Пластинку сушат на воздухе в течение 10 мин, затем помещают в камеру, предварительно насыщенную не менее 1 ч, со смесью растворителей: этилацетат-муравьиная кислота-уксусная кислота-вода (100:11:11:26) и хроматографируют восходящим методом. Когда фронт растворителей пройдет 8 см от линии старта, пластинку вынимают из камеры, сушат на воздухе в течение 10 мин и просматривают в УФ-свете при длине волны 254 нм и 365 нм, опрыскивают спиртовым 5 %-ным раствором алюминия хлорида.

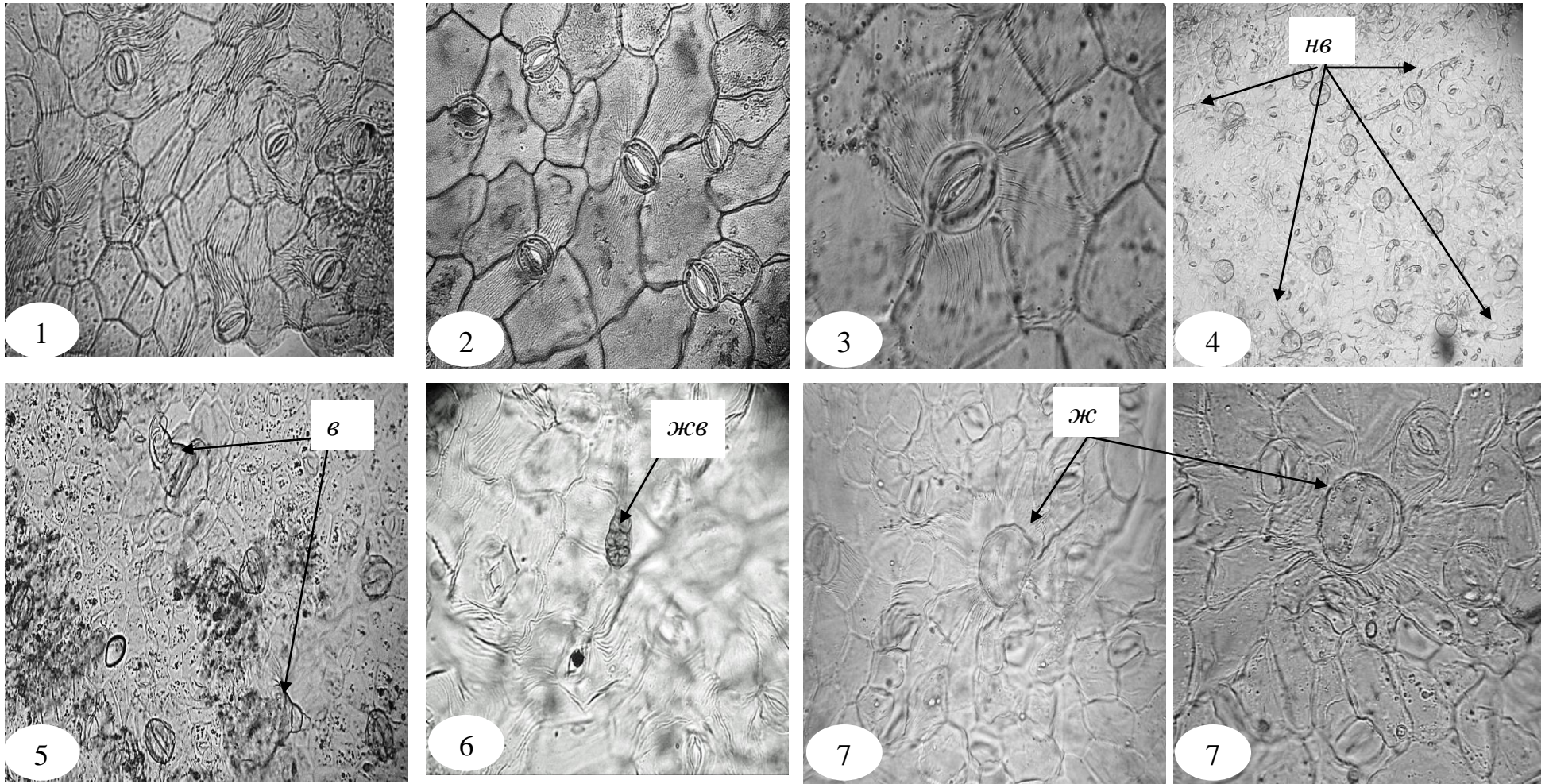


Рис. 1. Сосюра горькая. Верхний (1) и нижний (2) эпидермис. Лучисто-морщинистая складчатость кутикулы (3). Нитевидные волоски (4) *nb* – нитевидные волоски. Волоски, расширенные в месте прикрепления (5) *b* – волоски. Железистые «булавоподобные» волоски (6) *zhv* – железистые волоски. Куполообразные железки (7) *zh* – железки.

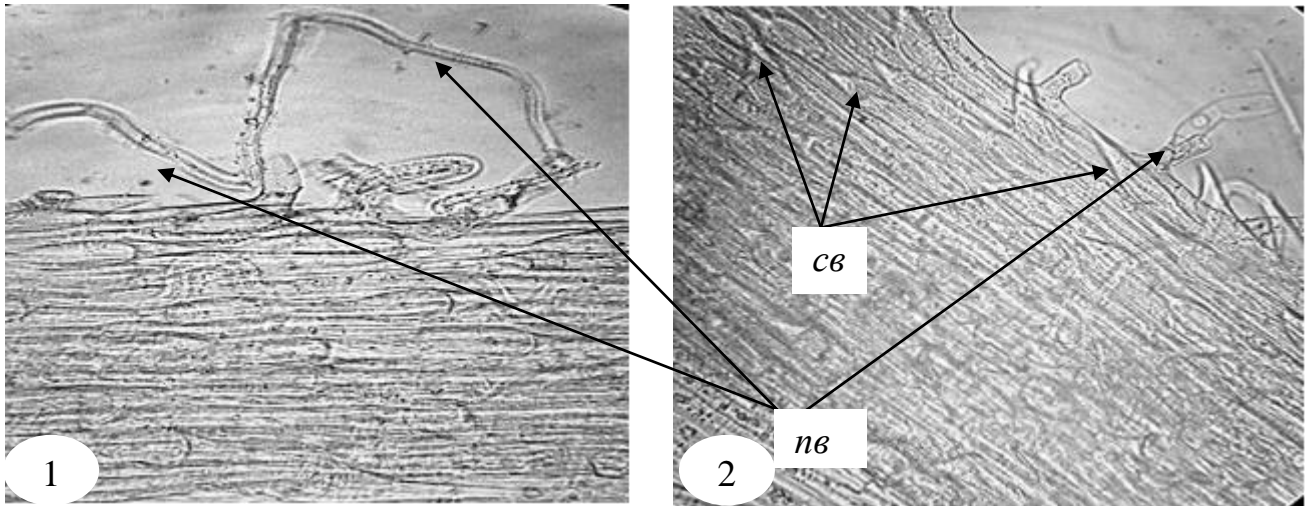


Рис. 2. Эпидермис обертки (1, 2), сосочковидные выросты и простые волоски *св* – сосочковидные выросты, *пв* – простые волоски.

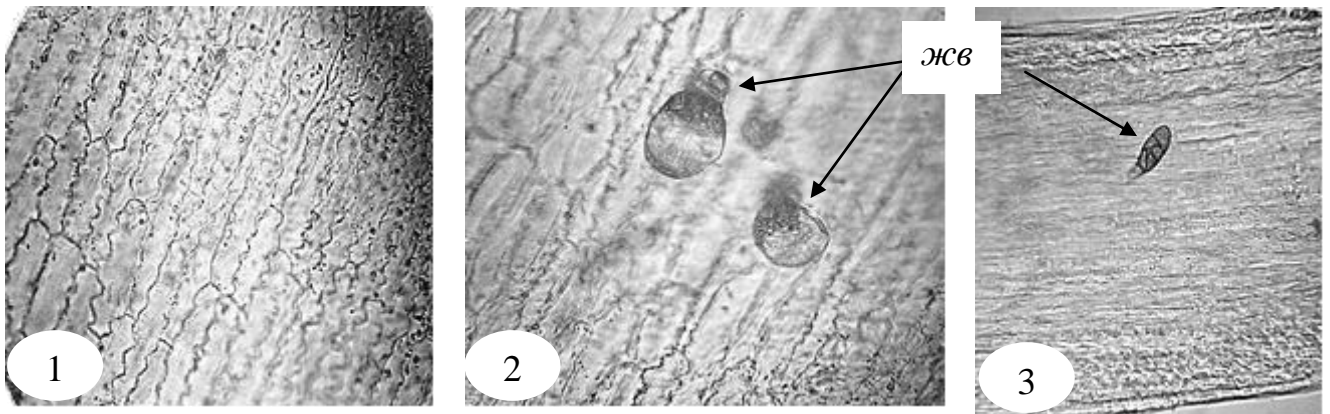


Рис. 3 Эпидермис трубчатого цветка (1), с железистыми волосками (2, 3), *жв* – железистые волоски.

На хроматограмме испытуемого раствора должна обнаруживаться зона адсорбции на уровне зоны адсорбции на хроматограмме раствора ГСО лютеолин-7-глюкозида желто коричневого цвета с R_f около 0,6. Кроме основной зоны адсорбции допускается наличие дополнительных зон адсорбции голубого цвета с R_f около 0,45 и 0,9 (хлорогеновая и кофейная кислоты соответственно).

Примечания:

1. *Подготовка пластинок.* Пластинки «Сорбфил» перед использованием активируют в сушильном шкафу при 100–105 °С в течение 1 ч. Пятна исследуемых растворов наносят поперек линиям накатки.

2. *Приготовление раствора государственного стандартного образца лютеолин-7-глюкозида.* 0,01 (т.н.) г лютеолин-7-глюкозида помещают в мерную

колбу на 25 мл, добавляют 10 мл 95% спирта, растворяют на кипящей водяной бане, остужают до комнатной температуры и доводят 95% спиртом до метки.

УФ-спектр. УФ-спектр 70 % этанольного раствора в интервале длин волн от 190 нм до 400 нм должен иметь максимумы при длинах волн 268 ± 2 нм и 330 ± 2 нм.

Числовые показатели. *Цельное сырье* Содержание суммы сесквитерпеновых лактонов в пересчете на цинаропикрин не менее 0,5 %; содержание флавоноидов в пересчете на лютеолин не менее 2,0 %; экстрактивных веществ, извлекаемых 70%-ным этанолом, не менее 20 %; влажность не более 10 %; зола общая не более 10 %; зола нерастворимая в 10 %-ном растворе кислоты хлористоводородной не более 1 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, не более 10 %; других частей растения не более 0,5 %; органической примеси не более 1 %; минеральной примеси не более 0,5 %.

Измельченное сырье. Содержание суммы сесквитерпеновых лактонов в пересчете на цинаропикрин не менее 0,5 %; содержание флавоноидов в пересчете на лютеолин не менее 2,0 %; экстрактивных веществ, извлекаемых 70 %-ным этанолом, не менее 20 %; потеря в массе при высушивании не более 10 %; зола общая не более 10 %; зола нерастворимая в 10 %-ном растворе кислоты хлористоводородной не более 1 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, не более 3 %; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,25 мм, не более 1 %; других частей растения не более 0,5 %; органической примеси не более 1 %; минеральной примеси не более 0,5 %.

Микробиологическая чистота. Испытания проводят в соответствии с требованиями ОФС 42-0016-04, Категория 4Б.

Количественное определение. *Сесквитерпеновые лактоны.* Аналитическую пробу сырья травы сосюреи горькой измельчат до величины частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 0,1 измельченного сырья помещают в колбу вместимостью 100 мл, прибавляют 5 мл экстрагента (хлороформ-спирт этиловый 4:1), присоединяют к обратному холодильнику на водяной бане при температуре 55-60°C в течение 10 мин.

Экстракцию повторяют в указанных выше условиях трижды. Затем колбу охлаждают, перемешивают и фильтруют через бумажный фильтр, полученный раствор упаривают в вакууме. К сухому остатку приливают 10 мл подвижной фазы, растворяют и количественно переносят в мерную колбу вместимостью 25 мл. Доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают. 0,02 мл раствора вводят в хроматограф.

Приготовление рабочего стандартного образца цинаропикрина: Около 0,005 (т.н.) РСО цинаропикрина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, приливают 10 мл подвижной фазы, нагревают на водяной бане до полного растворения образца и охлаждают. Доводят объем раствора до метки тем же растворителем и перемешивают. 0,02 мл раствора вводят в хроматограф. Срок годности полученного раствора 1 сутки.

Содержание цинаропикрина X (%), в пересчете на массу сырья в траве сосюреи горькой, вычисляют по формуле:

$$X = \frac{S \times m_0 \times P \times 100 \times 100}{S_0 \times m \times (100 - W) \times 100}$$

где S_0 – площадь пика на хроматограмме раствора СО цинаропикрина;

S – площадь пика цинаропикрина на хроматограмме испытуемого раствора;

m_0 – навеска СО цинаропикрина, в г;

m – навеска сырья сосюреи горькой, в г;

W – потеря в массе при высушивании сырья, в %;

P – содержание цинаропикрина в стандартном образце цинаропикрина, в %.

Содержание сесквитерпеновых лактонов в траве сосюреи горькой должно быть не менее 0,5 %.

Примечания

1. Условия хроматографирования:

- состав подвижной фазы: метанол – вода в соотношении 50:50;
- детектирование при длине волны 204 нм;
- температура колонки - комнатная;
- скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин;

- объем вводимой пробы 20 мкл.

2. Для проверки пригодности хроматографической системы перед проведением ВЭЖХ-анализа испытуемых растворов необходимо хроматографировать по 20 мкл достоверного образца цинаропикрина, получая не менее 5 хроматограмм в условиях описанных выше. По результатам теста должны выполняться следующие условия:

- эффективность хроматографической колонки, рассчитанной для пика цинаропикрина на хроматограммах достоверного образца должна составлять не менее 3500 теоретических тарелок.

- относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика цинаропикрина на хроматограммах достоверного образца, не более 0,5 %.

Флавоноиды. Аналитическую пробу сырья травы сосюреи горькой измельчают до величины частиц проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм. Около 1,0 г измельченного сырья помещают в колбу со шлифом вместимостью 150 мл, прибавляют 30 мл 90% спирта, содержащего 1% концентрированной хлористоводородной кислоты, колбу присоединяют к обратному холодильнику и нагревают на кипящей водяной бане в течение 30 мин. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры и фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу вместимостью 100 мл. Экстракцию повторяют еще раз указанным выше способом, затем еще 1 раз 90% спиртом в течение 30 мин. Извлечения фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу, промывают фильтр 90% спиртом и доводят объем фильтрата 90% спиртом до метки (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещают 4 мл раствора А, прибавляют 4 мл 5% раствора алюминия хлорида в 95% спирте и доводят объем раствора 95% спиртом до метки. Через 20 мин измеряют оптическую плотность раствора на спектрофотометре при длине волны 400 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя поглощения 10 мм. В качестве раствора сравнения используют раствор, состоящий из 4 мл раствора А, доведенного 95% спиртом до метки в мерной колбе вместимостью 25 мл.

Государственный стандартный образец лютеолина готовили следующим образом: точную навеску 0,0010 г стандартного образца лютеолина растворяют в 20 мл 90% этилового спирта в мерной колбе вместимостью 25 мл при нагревании на водяной бане. После охлаждения доводят объем раствора до метки этиловым спиртом и перемешивают. Срок годности полученного раствора 7 суток.

Содержание суммы флавоноидов в пересчете на лютеолин и абсолютно сухое сырье в процентах (X) вычисляют по формуле:

$$X = \frac{A_1 \times a_0 \times 100 \times 25 \times 100 \times 100}{A_0 \times a_1 \times 4 \times 25 \times (100 - W)}$$

где A_1 - оптическая плотность исследуемого раствора;

A_0 - оптическая плотность стандартного раствора лютеолина;

a_0 - масса стандартного образца лютеолина, в г;

a_1 - масса сырья, в г;

W - потеря в массе при высушивании сырья, в %;

100, 4, 25, 25 – объем разведений, в мл.

Содержание флавоноидов в траве сосюреи горькой должно быть не менее 2,0%.

Упаковка. Цельное сырье упаковывается по 15 кг в мешки бумажные многослойные по ГОСТ 2226-88; в мешки полипропиленовые из пропилена окрашенного по ГОСТ 26 996-86, для лекарственных средств или пищевых продуктов; по 20 кг в мешки тканевые продуктовые по ГОСТ 30 090-93.

На мешки наклеивают этикетку из бумаги этикеточной по ГОСТ 7625-86, бумаги писчей по ГОСТ 18 510-87.

Маркировка. На этикетке указывают: наименование предприятия-изготовителя, его товарный знак, юридический адрес, название лекарственного средства на русском и латинском языках, масса 15 или 20 кг при влажности 10 %, регистрационный номер, номер серии, срок годности, условия хранения, условия отпуска, способ применения и дозы, «Продукция прошла радиационный контроль», штриховой код.

Маркировка транспортной тары в соответствии с ГОСТ 14192-96

Транспортирование. В соответствии с требованиями ГОСТ 6077-80, ГОСТ 14 192-96.

Хранение. В соответствии с ГОСТ 6077-80 и ГФ XI, вып. 1, с. 296.

В сухом прохладном, защищенном от света месте.

Срок годности. 2 года.

Противоописторхозное и гепатопротекторное средство.

Примечание.

1. Методики анализа, реактивы (титрованные растворы), методики определения числовых показателей описаны в соответствующих разделах Государственной фармакопеи XI издания, вып. 1 и 2.
2. Фирма гарантирует безвозмездную поставку в ИСЛС стандартных образцов, используемых при контроле качества препарата.
3. Для проверки пригодности хроматографической системы перед проведением ВЭЖХ-анализа испытуемых растворов необходимо хроматографировать по 20 мкл достоверного образца цинаропикрина, получая не менее 5 хроматограмм в условиях описанных выше. По результатам теста должны выполняться следующие условия:
 - эффективность хроматографической колонки, рассчитанной для пика цинаропикрина на хроматограммах достоверного образца должна составлять не менее 3500 теоретических тарелок.
 - относительное стандартное отклонение, рассчитанное для площади пика цинаропикрина на хроматограммах достоверного образца, не более 0,5 %.

Ректор Омской государственной
медицинской академии

_____ А.И. Новиков
“ _____ ” _____ 20__ г.

СОГЛАСОВАНО:

Директор Института стандартизации _____ Е. И. Саканян

лекарственных средств ФГУ НЦЭСМП “_____” _____ 20__ г.

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ГБОУ ВПО ОмГМА Минздрав
России, профессор

_____ А.И. Новиков

«_____» _____ 201 г

**ИНСТРУКЦИЯ
ПО СБОРУ И СУШКЕ
ТРАВЫ СОССЮРЕИ ГОРЬКОЙ**

Соссюрея горькая (*Saussurea amara* (L.) DC.) – многолетнее травянистое растение семейства сложноцветных.

Стебли прямые высотой до 70 см, ребристые, в верхней части ветвистые, шероховатые или голые. Прикорневые и нижние листья эллиптические, черешковые 5-20 см длиной и 1,5- 9 см шириной, выемчато-неравнозубчатые, редко цельнокрайные; стеблевые – короткочерешковые или сидячие, более мелкие, иногда немного низбегающие, цельнокрайные. Все с обеих сторон зеленые, снизу бледнее и здесь с многочисленными железками. Корзинки колокольчатые, собраны в щитковидное соцветие; обертки черепитчатые, коротко-волосистые или слегка паутинистые; наружные листочки обертки короткие, ланцетные, острые или на верхушке зубчатые, средние – на верхушке расширенные в округлые, пленчатые, по краям зазубренные придатки розового цвета, самые внутренние листочки узкие, почти без придатков. Цветоложе корзинки густо покрыто линейно-шиловидными, блестящими, неравными пленками. Все цветки в корзинке обоеполые, трубчатые, фиолетово-розовые; пыльники белые, придатки пыльников коротко и слабо волосистые. Плоды – гладкие семянки с двойным хохолком, без коронки.

Соссюрея горькая произрастает в лесостепных и южных лесных районах Южного Урала, Сибири и Дальнего Востока. Растет на солонцеватых лугах, степях, болотах, иногда встречается по берегам соленых озер.

В качестве лекарственного сырья используют траву. Основные заготовки травы соссюреи горькой проводят в августе - первой половине сентября. Верхнюю часть (15-20 см) травы соссюреи горькой срезают серпом или ножом и рыхло укладывают в проветриваемую тару (корзины, мешки). В течение двух часов доставляют к месту сушки. Используют естественную воздушно-теневую сушку, раскладывая сырье на бумаге или ткани не толще 3 см под навесами или на чердаках с хорошей вентиляцией. Сушка на солнце не допускается. Допускается искусственная сушка в сушилках барабанного и конвейерного типа при температуре нагрева травы 50-60°C. Выход сухого сырья составляет около 30% от массы свежесобранного сырья. После сушки из травы соссюреи горькой

удаляют части сырья утратившие естественную окраску (пожелтевшие, побуревшие, почерневшие и др.), а также части растений, не подлежащих к заготовке (корни) и посторонние примеси.



Рис. 1. Соссюрея горькая

Готовое сырье соссюреи горькой должно соответствовать следующим требованиям проекта ФС: Смесь цельных или частично измельченных листовых побегов длиной до 30 см. Стебли округлые ребристые, шероховатые, голые. Листья короткочерешковые или сидячие, иногда немного низбегающие, цельнокрайние 2-10 см длины, 0,15-1,5 см ширины. Корзинки колокольчатые 1-1,5 см шириной в виде щитковидного соцветия. Обертки черепитчатые, коротковолосистые или слегка паутинистые. Наружные листочки их короткие, ланцетные, острые или на верхушке зубчатые, средние – на верхушке расширенные в округлые, пленчатые, по краям зазубренные, придатки розового цвета; самые внутренние листочки узкие, почти без придатков. Цветоложе густопленчатое; пленки линейно-шиловидные, блестящие, неравные, до 7 мм длиной. Цветки фиолетово-розовые, пыльники белые. Придатки пыльников коротко и слабо

волосистые. Цвет стеблей и листьев серовато-зеленый, запах своеобразный ароматный, вкус водного извлечения горький.

Числовые показатели: Содержание суммы сесквитерпеновых лактонов в пересчете на цинаропикрин не менее 0,5 %; содержание флавоноидов в пересчете на лютеолин не менее 2,0 %; экстрактивных веществ, извлекаемых 70%-ным этанолом, не менее 20%; влажность не более 10%; зола общая не более 10%; зола нерастворимая в 10%-ном растворе кислоты хлористоводородной не более 1%; частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, не более 10 %; почерневших и побуревших частей растения не более 2%; органической примеси не более 0,5%; минеральной примеси не более 0,5%.

Высушенную траву соссуреи горькой упаковывают в тюки по 15 кг. Хранят на стеллажах, в сухом, хорошо проветриваемом помещении, защищенном от прямых солнечных лучей. Срок годности сырья 3 года.

Траву соссуреи горькой применяют в качестве противоописторхозного и гепатопротекторного средства.

Инструкцию составили:

Ст. преподаватель кафедры
фармацевтической, аналитической
и токсикологической химии

ГБОУ ВПО ОмГМА Минздрав РФ

Доцент кафедры
фармацевтической, аналитической
и токсикологической химии

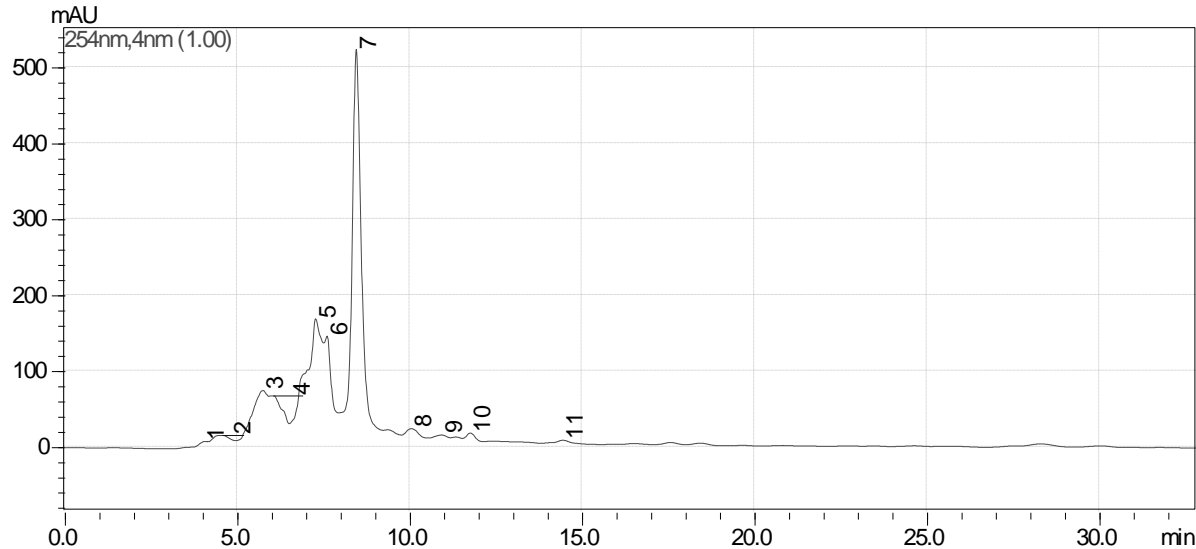
ГБОУ ВПО ОмГМА Минздрав РФ,

канд. фарм. наук

И. С. Погодин

Е. А. Лукша

Хроматограммы извлечений сосюреи горькой



состав подвижной фазы:
ацетонитрил – вода в соотношении
50:50;
температура колонки - комнатная;
скорость подвижной фазы 0,5
мл/мин;

№ пика	Наименование	Время удерживания, мин	Максимум поглощения в УФ спектре, нм	Количественное содержание в пробе, в %
1	Не идентифицированное вещество	4,01	346, 265	0,47
2	Умбеллиферон	4,57	326, 267	1,93
3	Не идентифицированное вещество	5,73	-	9,96
4	Галловая кислота	6,05	277	7,43
5	Не идентифицированное вещество	7,25	-	24,61
6	Сиреневая кислота	7,59	265, 219	9,30
7	Апигенин	8,43	336, 267	44,04
8	Не идентифицированное вещество	10,02	279, 227	0,97
9	Не идентифицированное вещество	10,91	-	0,34
10	Не идентифицированное вещество	11,74	-	0,63
11	Не идентифицированное вещество	14,42	-	0,33

Рис. 1 Хроматограмма хлороформного извлечения сосюреи горькой

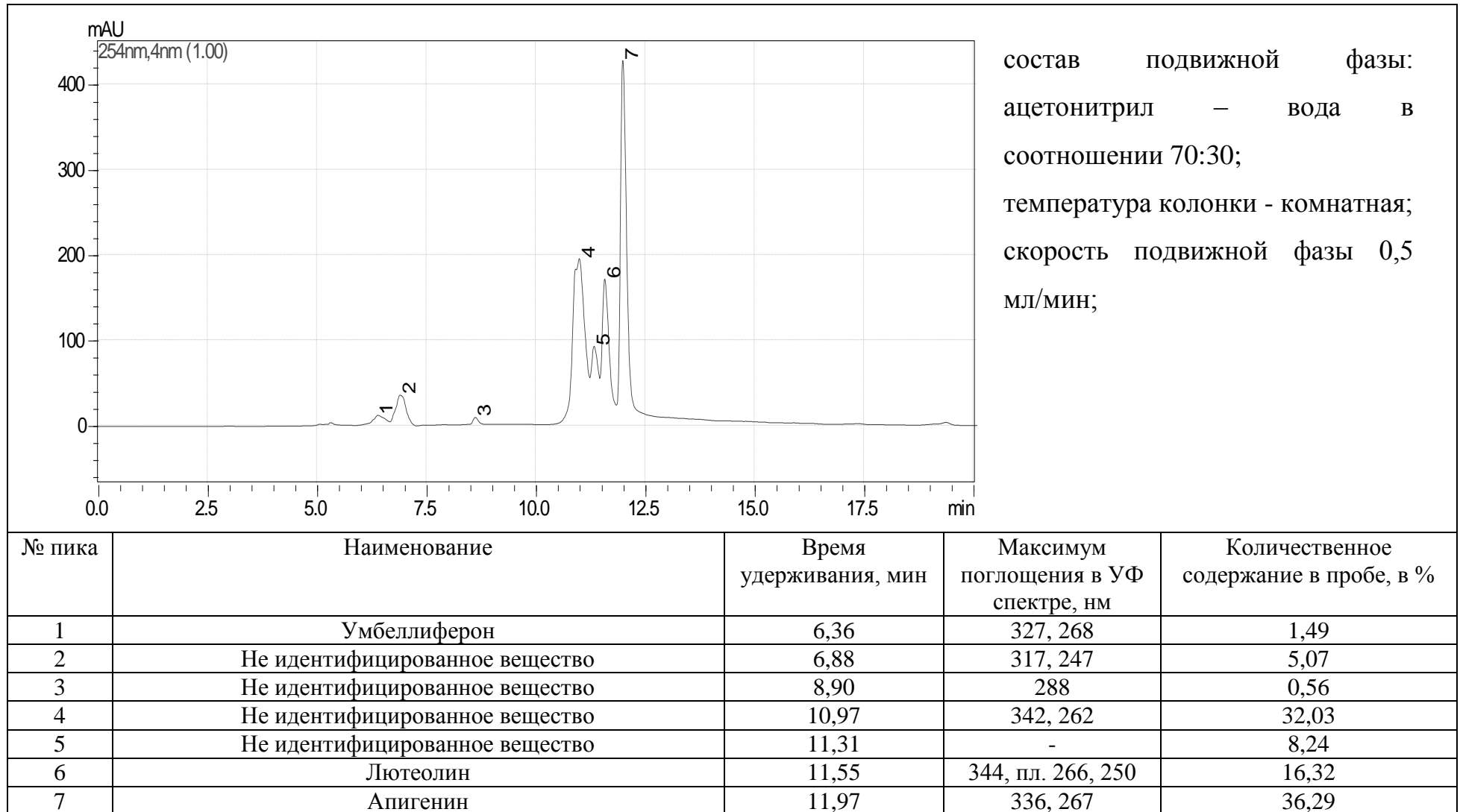
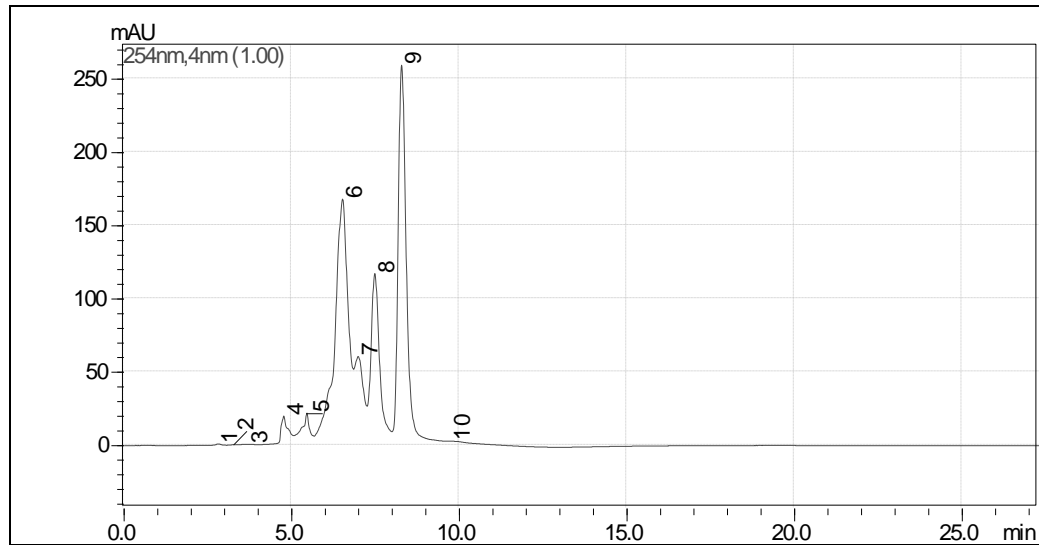


Рис.: 2 – Хроматограмма фракции ЭФ-1



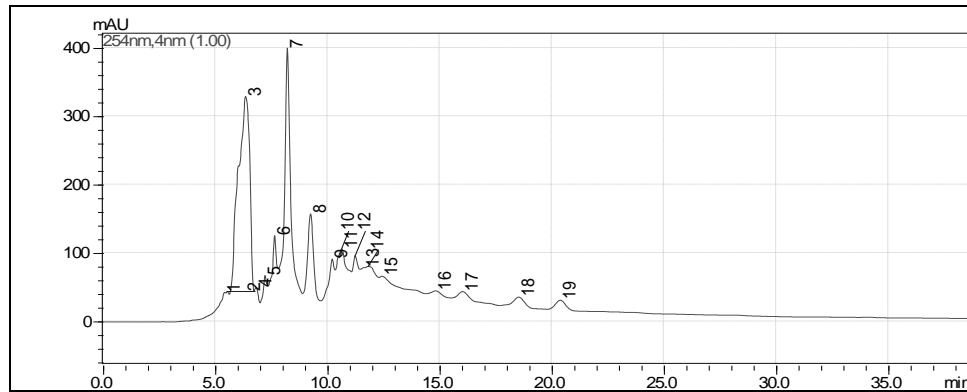
состав подвижной фазы: ацетонитрил – вода в соотношении 30:70;

температура колонки - комнатная;

скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин;

№ пика	Наименование	Время удерживания, мин	Максимум поглощения в УФ спектре, нм	Количественное содержание в пробе, в %
1	Не идентифицированное вещество	2,80	-	0,09
2	Не идентифицированное вещество	3,28	224	0,07
3	Не идентифицированное вещество	3,70	223	0,19
4	Не идентифицированное вещество	4,76	330, 266	2,55
5	Кофейная кислота	5,45	325, 215	2,95
6	Гликозид апигенина	6,51	340, 255	34,49
7	Не идентифицированное вещество	6,98	314, 288, 268	8,41
8	Лютеолин-7-глюкозид	7,47	346, 266, 251	15,91
9	Апигенин	8,27	336, 267	35,27
10	Не идентифицированное вещество	9,73	326, 268	0,07

Рис. 3 Хроматограмма фракции ЭФ-2



состав подвижной фазы: ацетонитрил – вода в соотношении 70:30;

температура колонки - комнатная;

скорость подвижной фазы 0,5 мл/мин;

№ пика	Наименование	Время удерживания, мин	Максимум поглощения в УФ спектре, нм	Количественное содержание в пробе, в %
1	Не идентифицированное вещество	5,39	324, 298	2,21
2	Не идентифицированное вещество	5,51	323, 295	0,96
3	Не идентифицированное вещество	6,32	255	36,05
4	Не идентифицированное вещество	6,80	285	1,30
5	Не идентифицированное вещество	7,19	267	2,06
6	Не идентифицированное вещество	7,62	265	5,00
7	Лютеолин-7-глюкозид	8,18	348, 267, 253	22,80
8	Гликозид лютеолина	9,22	341, 264	7,38
9	Не идентифицированное вещество	10,18	281, 267	3,08
10	Не идентифицированное вещество	10,46	265	1,78
11	Не идентифицированное вещество	10,62	330, 312, 292	2,08
12	Не идентифицированное вещество	11,21	324, 268	3,28
13	Не идентифицированное вещество	11,58	267	1,69
14	Не идентифицированное вещество	11,79	267	3,77
15	Не идентифицированное вещество	12,41	-	2,47
16	Не идентифицированное вещество	14,80	271	0,49
17	Не идентифицированное вещество	15,99	272, 225	1,03
18	Не идентифицированное вещество	18,50	273	1,24
19	Не идентифицированное вещество	20,35	274	1,33

Рис. 4 Хроматограмма фракции ЭФ-3

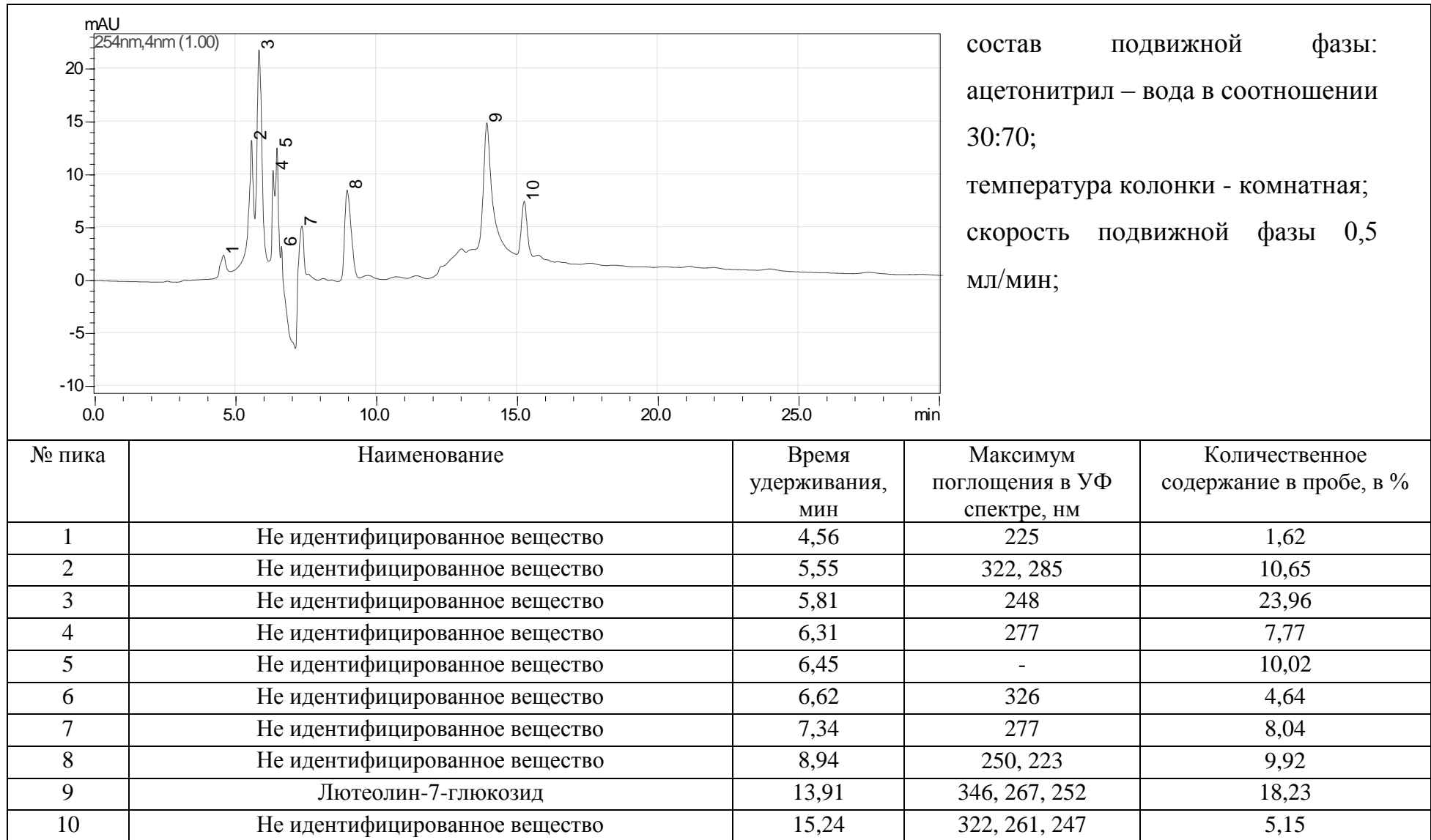


Рис. 5 Хроматограмма фракции ЭФ-4

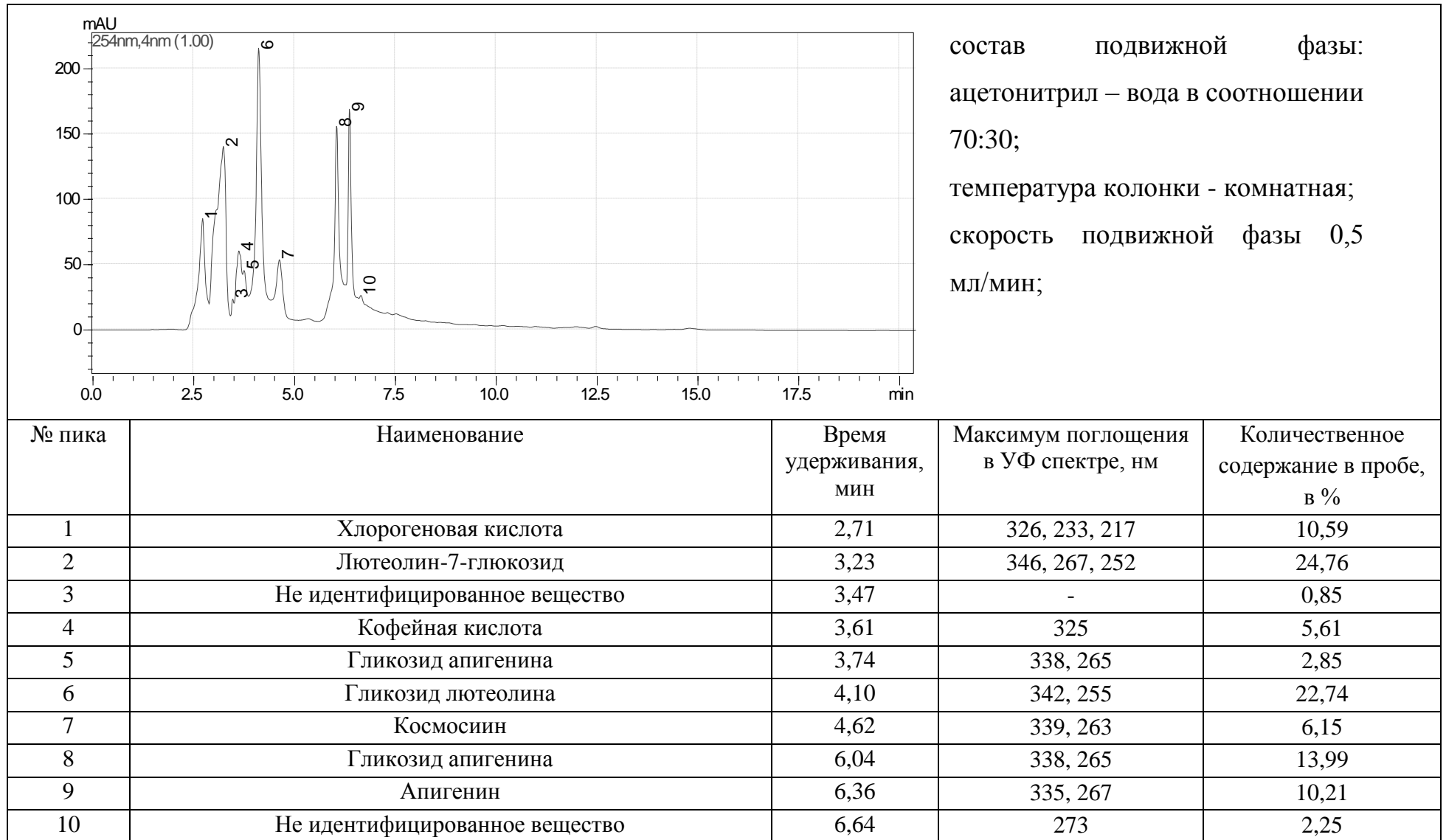


Рис. 6 Хроматограмма фракции БФ-1

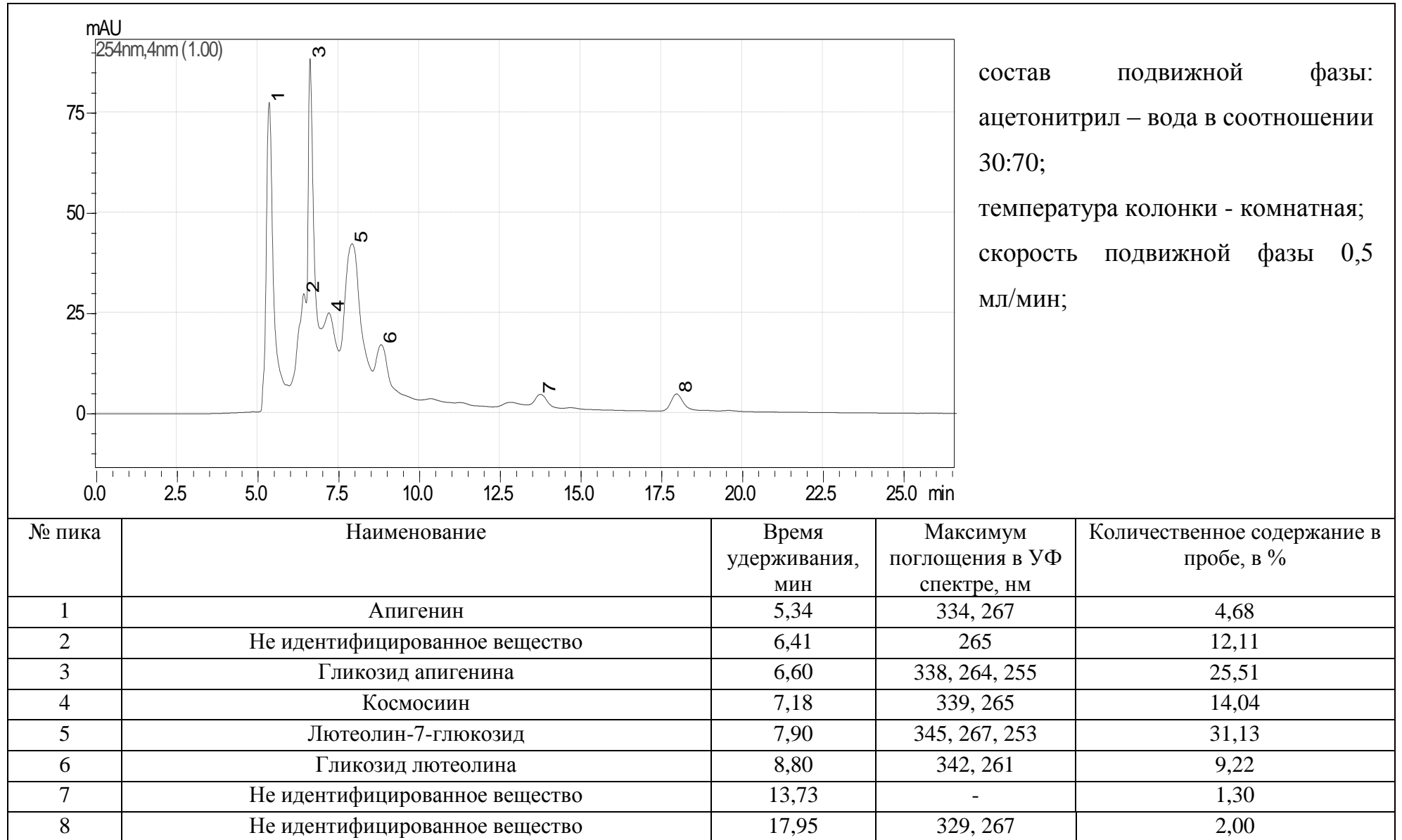
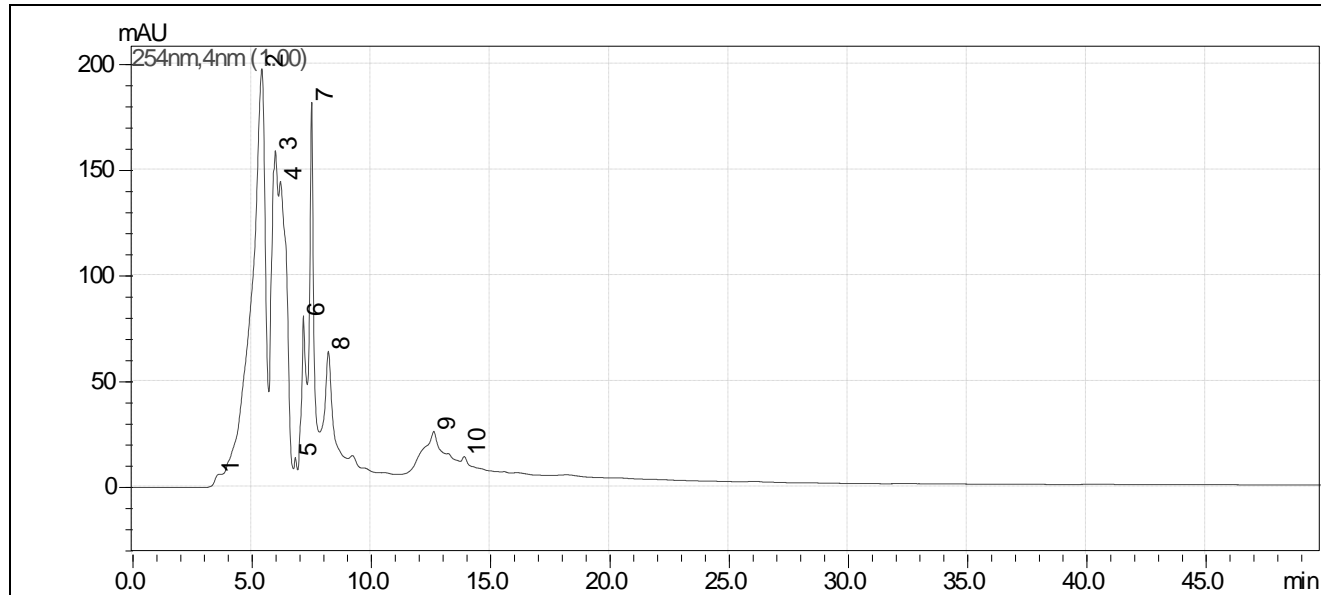


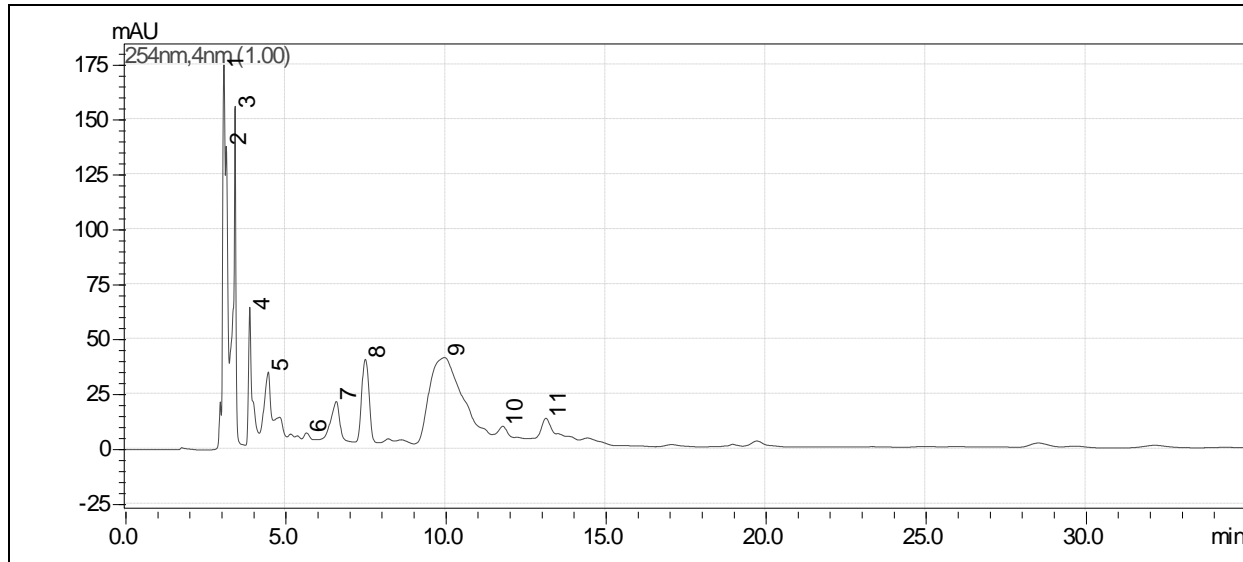
Рис. 7 Хроматограмма фракции БФ-2



состав подвижной фазы:
ацетонитрил – вода в соотношении
50:50;
температура колонки - комнатная;
скорость подвижной фазы 0,5
мл/мин;

№ пика	Наименование	Время удерживания, мин	Максимум поглощения в УФ спектре, нм	Количественное содержание в пробе, в %
1	Не идентифицированное вещество	3,55	329, 267	0,63
2	Не идентифицированное вещество	5,40	329, 256	42,16
3	Не идентифицированное вещество	5,97	335, 264	15,58
4	Не идентифицированное вещество	6,18	327	16,36
5	Не идентифицированное вещество	6,80	329, 251	0,14
6	Не идентифицированное вещество	7,14	336, 255	4,83
7	Гликозид апигенина	7,49	340, 256	10,91
8	Гликозид лютеолина	8,19	342, 261	6,62
9	Не идентифицированное вещество	12,61	328, 267	2,59
10	Не идентифицированное вещество	13,89	329, 262	0,18

Рис. 8 Хроматограмма фракции БФ-3



состав подвижной фазы:
ацетонитрил – вода в соотношении
30:70;
температура колонки - комнатная;
скорость подвижной фазы 0,5
мл/мин;

№ пика	Наименование	Время удерживания, мин	Максимум поглощения в УФ спектре, нм	Количественное содержание в пробе, в %
1	Не идентифицированное вещество	3,06	323, 294, 241	14,59
2	Не идентифицированное вещество	3,14	323, 293, 282, 245	10,37
3	Не идентифицированное вещество	3,40	324, 296, 285	14,24
4	Феруловая кислота	3,87	323, 297	6,37
5	Хлорогеновая кислота	4,44	326, 233, 217	4,08
6	Не идентифицированное вещество	5,64	282	0,42
7	Лютеолин	6,57	344, пл. 266, 251	4,54
8	Галловая кислота	7,47	270, 219	8,83
9	Космосиин	9,94	339, 265	33,76
10	Не идентифицированное вещество	11,77	328	0,74
11	Не идентифицированное вещество	13,12	-	2,06

Рис. 9 Хроматограмма фракции БФ-4

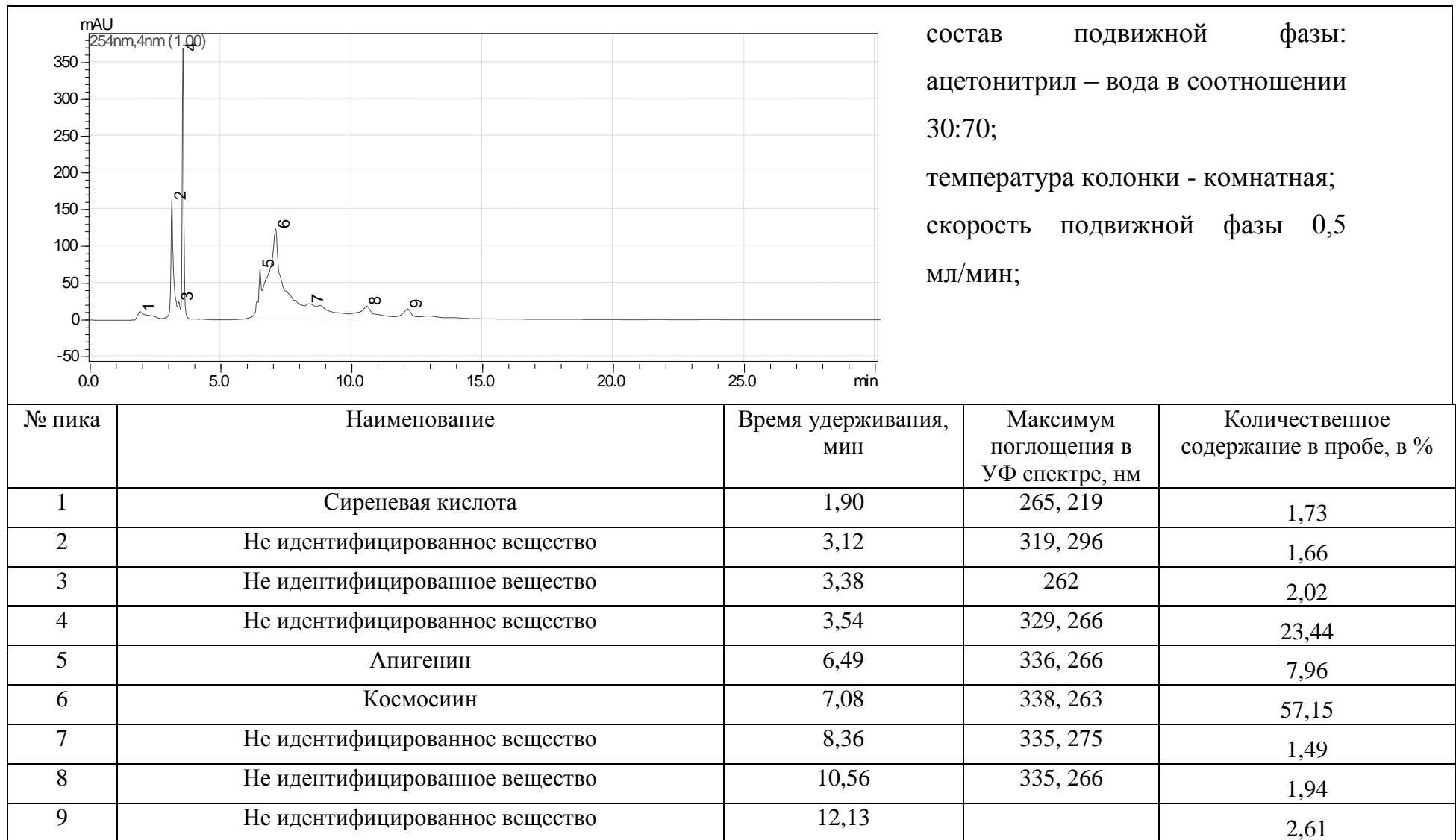


Рис. 10 Хроматограмма водного остатка сосюреи горькой

УТВЕРЖДАЮ

Директор БУ ОО «ТЦ СКР Омской области»

Ганз Ю. В. Романчук
 «СВ» 2012



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. Предложение для внедрения: Методические рекомендации «Количественное определение сесквитерпеновых лактонов методом ВЭЖХ в траве сосюреи горькой».

2. Кем разработано: коллективом авторов фармацевтического факультета ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 2012 г.

3. Авторы: ассистент кафедры фармации ГБОУ ВПО ОмГМА Минздравсоцразвития России Погодин И.С.; зав. кафедрой фармацевтической, аналитической и токсикологической химии ГБОУ ВПО ОмГМА Минздравсоцразвития России, канд. фарм. наук Лукша Е.А.; заместитель министра здравоохранения Омской области, начальник управления по фармацевтической деятельности и производству лекарств Министерства здравоохранения Омской области, канд. фарм. наук Шукиль Л.В.

4. Где внедрено: Территориальный центр по сертификации и контролю качества лекарственных средств Омской области, г. Омск.

5. Эффективность внедрения: обеспечение контроля качества лекарственного растительного сырья «Сосюреи горькой трава».

6. Замечания и предложения: целесообразно рекомендовать использование при контроле качества лекарственного растительного сырья «Сосюреи горькой трава».

Ответственный за внедрение

Ганз *Романчук*
 Ю. В. Романчук
 70.8

УТВЕРЖДАЮ
 Директор БУ ОО «ТЦ СЗК Лекарства»

Ю.Ф. Романчук
 Ю.Ф. Романчук
 «СЗ» с.д.н.н.с.р. 2012 г.



АКТ ВНЕДРЕНИЯ

1. Предложение для внедрения: Методические рекомендации «Количественное определение флавоноидов в траве соссюреи горькой».

2. Кем разработано: коллективом авторов фармацевтического факультета ГБОУ ВПО «Омская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации, 2012 г.

3. Авторы: ассистент кафедры фармации ГБОУ ВПО ОмГМА Минздравсоцразвития России Погодин И.С.; зав. кафедрой фармацевтической, аналитической и токсикологической химии ГБОУ ВПО ОмГМА Минздравсоцразвития России, канд. фарм. наук Лукша Е.А.; заместитель министра здравоохранения Омской области, начальник управления по фармацевтической деятельности и производству лекарств Министерства здравоохранения Омской области, канд. фарм. наук Шукиль Л.В.

4. Где внедрено: Территориальный центр по сертификации и контролю качества лекарственных средств Омской области, г. Омск.

5. Эффективность внедрения: обеспечение контроля качества лекарственного растительного сырья «Соссюреи горькой трава».

6. Замечания и предложения: целесообразно рекомендовать использование при контроле качества лекарственного растительного сырья «Соссюреи горькой трава».

Ответственный за внедрение

Ю.Ф. Романчук
 Ю.Ф. Романчук
 Ю.Ф.

УТВЕРЖДАЮ

Ректор ГБОУ ВПО КрасГМУ
им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого
Минздрава России
И.П. Артюхов
2013г.

**АКТ ВНЕДРЕНИЯ**

(использования) результатов диссертационной работы
Погодина Ильи Сергеевича

**«Фармакогностическое исследование сосюреи горькой как
перспективного источника биологически активных веществ»,**
представленной на соискание ученой степени кандидата фармацевтических
наук по специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Комиссия в составе:

председатель – заведующая кафедрой биологической химии с курсами
медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, д.м.н.,
профессор А.Б. Салмина

члены комиссии: доцент кафедры биологической химии с курсами
медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, к.б.н., доцент
Л.В. Труфанова, доцент кафедры биологической химии с курсами
медицинской, фармацевтической и токсикологической химии, к.фарм.н. Н.В.
Кувачева

составили настоящий акт о том, что результаты диссертационной работы
И.С. Погодина, оформленные в виде методической рекомендации
«Количественное определение флавоноидов в траве сосюреи горькой»
внедрены в учебный и научно-исследовательский процесс при работе со
студентами и соискателями кафедры биологической химии с курсами
медицинской, фармацевтической и токсикологической химии
Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего
профессионального образования «Красноярский государственный
медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого»
Министерства здравоохранения Российской Федерации. (660022,
Красноярский край, г. Красноярск, улица Партизана Железняка, дом 1) при
изучении вопросов валидационной оценки методик фитохимического
анализа, при разработке методик количественного определения флавоноидов
в лекарственном растительном сырье.

Председатель:  А.Б. Салмина

Члены комиссии:  Л.В. Труфанова
 Н.В. Кувачева

