На правах рукописи

Сайбель Ольга Леонидовна

КОМПЛЕКСНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РАСТЕНИЙ ПРИ РАЗРАБОТКЕ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И ПРОДУКТОВ ПИЩЕВОГО НАЗНАЧЕНИЯ

3.4.2 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук

Улан-Удэ – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР)

Научный консультант:
Даргаева Тамара Дарижаповна – доктор фармацевтических наук, профессор

Официальные оппоненты:
Саканян Елена Ивановна – доктор фармацевтических наук, профессор, АО «НПО «Микроген», директор по науке
Лубсандоржиева Пунцык-Нима Базыровна – доктор фармацевтических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей и экспериментальной биологии» Сибирского отделения Российской академии наук / лаборатория медико-биологических исследований, старший научный сотрудник
Анцупова Татьяна Петровна – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Восточно-Сибирский государственный университет технологий и управления» Министерства науки и высшего образования РФ / кафедра неорганической и аналитической химии, профессор

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ

Защита состоится «30» июня 2022 г. в 14.00 часов на заседании диссертационного совета 99.0.045.03 при ФГБУН «Институт общей и экспериментальной биологии» СО РАН по адресу: 670047, г. Улан-Удэ, ул. Сахьяновой, 6.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной научной библиотеке Бурятского научного центра СО РАН и на сайте ИОЭБ СО РАН: http://igeb.ru.

Автореферат разослан «28» марта 2022 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор биологических наук, доцент В.Б. Хобракова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В настоящее время одним из приоритетов государственной политики в области лекарственного обеспечения Российской Федерации является расширение возможности применения системой здравоохранения доступных и эффективных лекарственных средств для населения. Решение задач в рамках обозначенного направления достигается путём проведения исследований по поиску новых активных субстанций и создание на их основе инновационных лекарственных средств.

Среди источников получения фармацевтических субстанций особое место занимают лекарственные растения. Многолетний опыт народной, традиционной и официнальной медицины разных стран подтверждает эффективность применения лекарственных средств растительного происхождения для профилактики и лечения различных заболеваний. Преимущества их использования по сравнению с продуктами химического синтеза, определяют актуальность расширения номенклатуры применяемых в настоящее время лекарственных препаратов по средствам изучения новых видов растений.

Современный уровень проведения научных исследований по разработке лекарственных растительных препаратов представляет собой комплекс последовательных этапов, включающих обоснование выбора объекта исследования, фитохимическое изучение растительного сырья, разработку технологий получения субстанций, экспериментальное подтверждение её эффективности и безопасности, решение вопросов стандартизации. Наиболее эффективная реализация такого подхода может быть достигнута путём комплексной переработки растений, позволяющей создавать продукты лечебного и профилактического назначения с использованием ресурсосберегающих технологий.

В данном аспекте перспективными, на наш взгляд, объектами изучения являются представители семейства Астровых (*Asteraceae)* – цикорий обыкновенный (*Cichorium intybus* L.) и топинамбур (*Helianthus tuberosum* L.). Возможности комплексного использования данных растений позволяют обосновать и разработать концептуальную схему создания новых лекарственных средств и функциональных пищевых продуктов растительного происхождения.

Предлагаемая модель основывается на детальном исследовании дикорастущего цикория обыкновенного, обладающего значительных потенциалом заготовки отечественного сырья, а также изучение возможностей использования культивируемых сортов данного растения. Вместе с тем, общие биологические особенности корней цикория обыкновенного и клубней топинамбура, обусловливающие их промышленное использование в качестве инулинсодержащего сырья,

позволяют предложить единые подходы и к переработке надземной части этих растений, содержащих схожий набор веществ фенольной природы.

Результатом разработки безотходных технологий комплексного использования растений и их внедрения в практику в рамках импортозамещения будут служить фармацевтические субстанции и функциональные пищевые продукты, применение которых в профилактических и лечебных целях будет способствовать сохранению здоровья населения Российской Федерации.

Степень разработанности темы исследования

В современной научной литературе представлены работы отечественных и зарубежных ученых, посвященные фитохимическому исследованию новых видов лекарственных растений (В.А. Куркина, Е.В. Авдеевой, В.Н. Бубенчиковой, Т.Л. Киселевой, О.Г.Потаниной, J.H. Doughari, A. R. Abubakar, N. N. Azwanida и др.). Возможности использования современных физико-химических методов анализа в идентификации биологически активных веществ (БАВ) растений обозначены в работах J.L.Wolfender, K. Hostettmann, V. Exarchou, C. Carazzone, D. Mascherpa, G. Gazzani. Теоретическую основу диссертационной работы составили труды, рассматривающие методические вопросы разработки новых лекарственных растительных средств и решения вопросов их стандартизации (В.И. Глызина, С.М. Николаева, В.А. Куркина и др.). Публикации по исследованию цикория обыкновенного посвящены преимущественно изучению его корней (R.S. Peña-Espinoza, S.H.Kim, A. L. Al-Malki, O. M. Ahmed, G.Y. Li, Gilani A.H. Chandra K. Jasim, M., Malarz J. И др.); топинамбур рассматривается в научной литературе, прежде всего, в качестве инулинсодержащего сырья (М.И. Ярошевич, В.Н. Зеленков, И.И. Самокиш, E. Mansouri, T. Paseephol и др.).

Анализ данных по обозначенным выше вопросам свидетельствует о недостаточном изучении надземной части цикория обыкновенного и топинамбура, исследований динамики накопления и распределения БАВ в растениях, разработке методик стандартизации сырья и способов их переработки.

Таким образом, выбор темы диссертационного исследования продиктован необходимостью комплексного использования указанных растений с учетом ценности надземной и подземной частей, наличия дикорастущих и культивируемых видов, а также возможностей переработки их вторичного сырья. На основе полученных в ходе исследования данных обоснованы и разработаны ресурсосберегающие технологии, позволяющие получить фармацевтические субстанции гепатопротекторного и иммуномодулирующего действия, а также функциональные продукты пищевого назначения.

Целью настоящей работы является теоретическое обоснование и экспериментальное подтверждение перспективы комплексного

использования некоторых видов растений семейства Астровых (*Asteraceae)* как источников новых лекарственных средств и функциональных продуктов.

Для достижения указанной цели необходимо было решить следующие задачи:

- провести информационно-аналитическое исследование по данной проблеме и разработать концептуальную схему создания новых лекарственных средств на основе комплексного использования растений;
- изучить химический состав травы дикорастущего цикория обыкновенного, определить фармакогностические характеристики и показатели качества сырья, установить их нормы;
- обосновать использование сырья культивируемых растений для расширения сырьевой базы травы дикорастущего цикория обыкновенного;
- выявить закономерности накопления БАВ в траве цикория обыкновенного, обосновать выбор методик стандартизации;
- исследовать товароведческие показатели корней дикорастущего и культивируемого цикория обыкновенного, определить основные группы вторичных метаболитов;
- провести фармакогностическое исследование и изучить химический состав травы топинамбура, установить закономерности накопления БАВ в растении, разработать методики контроля качества;
- предложить способ получения стандартных образцов цикориевой и хлорогеновой кислот из листьев цикория обыкновенного и топинамбура;
- разработать рациональные технологии комплексного использования цикория обыкновенного и способ переработки травы топинамбура, оформить лабораторные регламенты на получение экстрактов сухих;
- подготовить нормативную документацию на новые виды лекарственного растительного сырья цикория обыкновенного и топинамбура, а также стандартные образцы цикориевой и хлорогеновой кислот.

Научная новизна

На основе обобщения данных литературы, анализа опыта традиционной медицины и проведенных исследований создана концептуальная схема разработки лекарственных средств на основе комплексного использования растений. Реализация представленной методологии осуществлена на примере безотходной переработки цикория обыкновенного и топинамбура, результатом которой явились фармацевтические субстанции иммуномодулирующего и гепатопротекторного действия, а также функциональные продукты пищевого назначения.

С использованием метода ВЭЖХ-УФ-МС/МС охарактеризован состав фенольного комплекса травы дикорастущего и листьев культивируемого цикория обыкновенного, при этом установлены различия в качественном составе доминирующих метаболитов. Выявлены особенности распределения

фенольных соединений в растении, изучена динамика их накопления в зависимости от фазы вегетации и места произрастания.

На основании результатов фракционирования и скрининга выявлено, что основной группой БАВ, определяющей биологическую активность экстрактов травы и листьев цикория обыкновенного, являются фенольные соединения, в связи с чем предложено проводить стандартизацию сырья по данной группе веществ.

На основании фитохимического изучения травы топинамбура показана возможность её использования для получения экстракта сухого иммуномодулирующего действия.

Разработан способ получения экстракта сухого из травы дикорастущего цикория обыкновенного, обладающего гепатопротекторным действием, обусловленный наличием фенольных соединений.

Впервые предложен унифицированный способ получения из цикория обыкновенного и топинамбура цикориевой и хлорогеновой кислот, которые используются в методиках подтверждения подлинности и количественного определения фенольных соединений в изучаемых объектах.

Результаты проведенных исследований вносят существенный вклад в разработку новых лекарственных средств растительного происхождения и могут служить новым подходом в создании ресурсосберегающих технологий получения фармацевтических субстанций целенаправленного фармакологического действия, а также функциональных продуктов. Возможности использования отходов возделывания пищевых растений (вторичного сырья) позволяют создавать отечественные лекарственные средства, доступные широким слоям населения и будут способствовать повышению эффективности профилактики заболеваний.

Теоретическая и практическая значимость работы

Полученные в ходе фитохимических исследований результаты дополняют информационный массив данных по составу, содержанию, распределению и динамике накопления БАВ в надземной и подземной частях цикория обыкновенного и траве топинамбура. Реализация предложенной концептуальной схемы разработки лекарственных средств на примере цикория обыкновенного и топинамбура позволяет рекомендовать её для использования при создании новых ресурсосберегающих технологий комплексной переработки растений.

Результаты, полученные в ходе исследования, внедрены в работу ФБУЗ ДЗ г. Москвы «Центр лекарственного обеспечения и контроля качества лекарственных средств», в учебный процесс и научно-исследовательскую работу ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России; Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский

университет», а также в работу ООО «Травы Башкирии», государственного предприятия «Бурят-Фармация» Минздрава Республики Бурятия.

На основании полученных данных оформлены проекты фармакопейных статей «Цикория обыкновенного трава» (направлен на рассмотрение в ФГБУ НЦЭСМП МЗ России (Исх.№ 43314/139 от 17.08.2021 г.), «Цикория обыкновенного листья», «Топинамбура трава»; технические условия ТУ 72.19.30-001-04868244-2018 «Цикориевая кислота – стандартный образец», ТУ 72.19.30-004-04868244-2021 «Хлорогеновая кислота – стандартный образец».

По результатам балансовых загрузок составлены и утверждены Лабораторный регламент ЛР-02468244-04-2021 на производство фармацевтической субстанции «Цикория обыкновенного травы экстракт сухой», ЛР-02468244-05-2021 на производство фармацевтической субстанции «Топинамбура травы экстракт сухой». Получена декларация о соответствии пищевых продуктов на основе травы цикория обыкновенного и травы топинамбура требованиям Евразийского экономического союза за № ЕАЭС N RU Д-RU.PA01.B.55681/21 от 28.06.2021 г.

Положения, выносимые на защиту:

- концептуальная схема создания новых лекарственных растительных средств и функциональных пищевых продуктов на основе комплексной переработки перспективных видов растений семейства Астровых;
- результаты исследований качественного состава и содержания фенольных соединений травы дикорастущего и листьев культивируемого цикория обыеновенного, а также травы топинамбура с использованием современных физико-химических методов анализа;
- оптимальные параметры экстракции, обепечивающие максимальный выход БАВ, положенные в основу разработки ресурсосберегающих технологий получения экстрактов сухих травы цикория обыкновенного и топинамбура;
- морфолого-анатомические признаки травы, листьев, корней цикория обыкновенного и травы топинамбура, позволяющие подтвердить подлинность исследуемых видов сырья;
- экспериментальный подбор условий проведения методик количественного определения фенольных соединений в пересчете на доминирующее вещество в изучаемых видах сырья и их валидационная оценка.

Методология и методы исследования

Теоретическую основу диссертационной работы составили труды В.И. Глызина, И.А. Самылиной, Т.А. Сокольской, О.Г. Потаниной, В.К. Колхира, С.М. Николаева и др., которые позволили наметить вектор перспективных исследований и обосновать возможности создания современных лекарственных средств из отечественного растительного сырья.

Методология исследований заключалась в теоретическом обосновании и экспериментальном подтверждении разработки рациональных технологий получения экстрактов сухих на основе комплексной переработки лекарственных растений.

Исследования проведены с использованием современных физико-химических методов анализа на аттестованном оборудовании.

Личный вклад автора

Автору принадлежит ведущая роль в выборе направления исследования, постановке цели и определении задач, выполнении экспериментальных работ, обобщении, анализе и статистической обработке полученных данных, оформлении и представлении научных работ.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 3.4.2 – фармацевтическая химия, фармакогнозия (фармацевтические науки). Результаты проведенного исследования соответствуют пунктам 2, 3, 6 паспорта специальности.

Связь задач исследований с проблемным планом

Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом научно-исследовательской работы ФГБНУ ВИЛАР по теме № FNSZ-2019-0010 «Поиск активных фракций природных соединений, разработка способов их получения из растительного сырья, методик стандартизации и создание на их основе современных лекарственных форм» (Регистрационный номер АААА-А20-117080910129-7).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов подтверждена проведением каждого эксперимента в нескольких повторностях с использованием поверенных и аттестованных приборов, последующей статистической обработкой полученных результатов, а также их сопоставлением с данными литературы.

Разработанные методики количественного определения валидированы. Выводы сформулированы на основе результатов экспериментальных исследований.

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на: III Научно-практической конференции «Молодые ученые и фармация XXI века» (Москва, 2015). XII Международном симпозиуме «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования». – (Пущино, 2017); Международной научной конференции «Перспективы лекарственного растениеведения», посвященной 100-летию со дня рождения профессора А.И. Шретера (Москва, 2018), XXVI Российского национального конгресса «Человек и лекарство» (Москва, 2019), IX international research to practice Conference «Traditional medicine: ways of consolidation with modern health care» (Ulan-Ude, 2019); IX Международной научно-практической конференции, посвященной 75-летию Победы в Великой Отечественной

войне. Формы и методы социальной работы в различных сферах жизнедеятельности (Улан-Удэ, 2020); Международной научной конференции «От растения до лекарственного препарата» (Москва, 2020); Международной научно-практической конференции «PLANTA+. Наука. Практика. Образование» (Киев, 2021); Международной научной конференции «90 лет – от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы» (Москва, 2021); III Международном симпозиуме «Innovations in life sciences» (Белгород, 2021); 5-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием «МедХим» (Волгоград, 2021); Annual Meeting American College of Clinical Clinical pharmacology in drug development (USA, 2021); Международной научно-практической конференции «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы» (Томск, 2021). VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной году науки и технологий «Перспективы внедрения инновационных технологий в медицине и фармации» (Электрогорск, 2021).

Публикации

По результатам диссертационной работы опубликованы 42 научные работы, в том числе 16 статей – в периодических изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ, 1 монография, получен патент РФ.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 248 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, 5 глав собственных исследований, обсуждения результатов, заключения, выводов, списка цитируемой литературы, включающего 278 источников, в том числе – 212 на иностранных языках. Работа иллюстрирована 81 рисунком и 47 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

1.Краткая характеристика объектов и методов исследования

Объекты исследования

- трава и корни дикорастущего цикория обыкновенного, заготовленные в Московской, Рязанской, Самарской, Белгородской, Липецкой, Тульской, Курской областях, Краснодарском крае, республике Башкортостан в 2015 – 2021 гг.

- листья и корни культивируемого цикория сортов Александрит, Tid, Spica K, заготовленные на опытных полях Ботанического сада ВИЛАР, а также на промышленных плантациях в Тульской и Липецкой областях (Сорт Голевский) в 2018 – 2021 гг.

- трава топинамбура, заготовленная в Московской, Тверской, Рязанской областях в 2018 – 2021 гг.

Фармакогностические исследования

Проводили согласно общим фармакопейным статьям ГФ РФ XIV по показателям: внешние признаки, микроскопические признаки, влажность, зола общая, зола нерастворимая в хлористоводородной кислоте, подлинность, органическая и минеральная примеси, радионуклиды, тяжелые металлы, остаточные пестициды.

Фитохимические исследования

Установление подлинности сырья и экстрактов проводили методом хроматографии в тонком слое сорбента (ТСХ) со стандартными образцами цикориевой, хлорогеновой кислот и эскулетина.

Качественный состав БАВ экстрактов и фракций изучали методом ВЭЖХ-УФ-МС/МС. Идентификацию вторичных метаболитов цикория обыкновенного и топинамбура проводили на основании интерпретации масс-спектров по характерным фрагментам ионного распада, характеристикам УФ-спектров, их сопоставлением с данными литературы, а также путем сравнения со спектрами индивидуальных соединений ранее выделенных нами веществ.

Количественное определение основных фенольных соединений проводили методом ВЭЖХ-УФ с использованием стандартных образцов.

Установление структуры индивидуальных соединений, выделенных из растений, проводили методом ЯМР-спектроскопии.

Количественное определение суммы фенольных соединений в сырье и экстрактах проводили методом прямой спектрофотометрии по разработанной нами методике.

Исследование шрота

Определение проводили по ГФ РФ XIV ОФС.1.2.30011.15 «Определение азота в органических соединениях методом Къельдаля», ГФ РФ XIV ОФС.1.2.3.0012.15 «Определение белка», ГФ РФ XIV ОФС.1.2.3.0022.15 «Определение аминного азота методами формольного и йодометрического титрования».

Количественное определение суммы аминокислот проводили методом спектрофотометрии при длине волны 568±2 нм по реакции с нингидрином в пересчете на глутаминовую кислоту.

Исследование биологической активности

Изучение гепатопротекторной активности, острой и хронической токсичности проводили в Центре доклинических исследований ФГБНУ ВИЛАР. Исследование иммуномодулирующей активности экстрактов и фракций осуществляли в Институте общей и экспериментальной биологии СО РАН (г. Улан-Удэ). Исследование суммарной антиоксидантной активности проводили методом кулонометрии с помощью электрогенерированного брома.

Статистическая обработка результатов анализа

В экспериментальной части работы результаты количественного определения суммы фенольных соединений и индивидуальных веществ

приведены в виде средних значений из трёх определений и стандартных отклонений (M±SD).

2.Концептуальная модель разработки лекарственных средств и функциональных продуктов на основе комплексного использования растений

Одним из приоритетных направлений стратегии инновационного развития фармацевтической отрасли Российской Федерации является проведение исследований, направленных на поиск новых источников биологически активных веществ для разработки отечественных лекарственных средств. Новизна предлагаемой концепции заключается в применении принципа комплексной использования растений, позволяющего разработать ресурсосберегающие технологии переработки растительного сырья и получить стандартизованные продукты лечебного и профилактического назначения (Рисунок 1).

Рисунок 1 – Концептуальная схема разработки новых лекарственных средств и функциональных продуктов на основе комплексной переработки растений

В создании таких продуктов можно обозначить следующие подходы:

- изучение качественного состава и содержания вторичных метаболитов всего растения и выбор вида растительного сырья (надземная или подземная часть) с учетом различий в компонентном составе БАВ;

- использование экологически безопасных органических растворителей, обеспечивающих избирательное извлечение целевых БАВ из каждого вида сырья одного растения;

- обоснование выбора оптимальных технологических параметров получения субстанций, обеспечивающих максимальный выход БАВ и создание рациональных схем их получения;

- разработка унифицированных методик качественного и количественного анализа БАВ, основанных на специфичности компонентного состава различных частей растения, позволяющих осуществлять стандартизацию по общепринятому принципу «от сырья до лекарственного препарата»;

- исследование возможности использования шрота после экстракции сырья для применения в качестве кормовых добавок в животноводстве или иных целей в народном хозяйстве;

- сравнительное изучение сырья дикорастущего и культивируемого растения для выявления особенностей и закономерностей накопления вторичных метаболитов;

- изучение возможности использования вторичного сырья (отходов производства) при выращивании растений для применения в пищевой промышленности;

- оценка накопления целевых БАВ в сортовых культурах изучаемых видах растений для выявления высокопродуктивных образцов и составления рекомендаций по заготовке и сушке лекарственного растительного сырья;

Таким образом, предлагаемая концепция представляет собой комплекс взаимосвязанных сегментов, включающих теоретические выводы и их экспериментальное подтверждение.

Результатом реализации последовательности данных этапов с использованием современных информационных, физико-химических и биологических методов будет служить фармацевтические субстанции с доказанной эффективностью и безопасностью, а также функциональные продукты пищевого назначения. При этом, комплексная переработка растений откроет возможности создания прогрессивных ресурсосберегающих технологий, позволяющих рационально использовать природные ресурсы и получать стандартизованные продукты со стабильными показателями качества.

В качестве модели наглядной реализации обозначенной концептуальной схемы выбран цикорий обыкновенный, обладающий согласно данным

народной и научной медицины потенциалом иммуномодулирующего, гепатопротекторного и антиоксидантного действия (Рисунок 2).

<table>
<tr><td colspan="4">Дикорастущее растение</td></tr>
<tr><td rowspan="3"> </td><td rowspan="2">Надземная часть (трава)</td><td>Экстракт сухой</td><td>Фармацевтическая субстанция гепатопротекторного действия</td></tr>
<tr><td>Шрот</td><td>Кормовая добавка</td></tr>
<tr><td>Подземная часть (корни)</td><td>Экстракт сухой</td><td>Фармацевтическая субстанция гепатопротекторного действия</td></tr>
<tr><td colspan="4">Культивируемое растение</td></tr>
<tr><td rowspan="4"> </td><td rowspan="2">Надземная часть (листья)</td><td>Экстракт сухой</td><td>Фармацевтическая субстанция иммуномодулирующего действия</td></tr>
<tr><td>Шрот</td><td>Кормовая добавка</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Подземная часть (корни)</td><td>Экстракт сухой</td><td>Фармацевтическая субстанция гепатопротекторного действия</td></tr>
<tr><td rowspan="2">Шрот</td><td>Инулин</td></tr>
<tr><td></td><td>Кормовая добавка</td></tr>
</table>

Рисунок 2 – Принципиальная схема комплексного использования цикория обыкновенного

С одной стороны, цикорий обыкновенный в дикорастущем виде имеет обширный ареал, что может обеспечить стабильную сырьевую базу для заготовки отечественного сырья в промышленных масштабах. С другой стороны, результатом многолетнего опыта культивирования цикория для получения пищевых продуктов, являются отработанные агротехнологии его возделывания и наличие высокопродуктивных корневых сортов. Учитывая особенности химического состава вторичных метаболитов, корни могут служить источником получения БАВ фенольной природы и инулина.

Вместе с тем, надземная часть культивируемого цикория, представленная листьями корневой розетки, является отходом производства при выращивании корней, которые заготавливаются в конце первого года вегетации, представляют интерес для изучения и использования в качестве сырья для получения фармацевтических субстанций.

Руководствуясь предлагаемым алгоритмом, показана возможность комплексного использования топинамбура.

Топинамбур является ценной пищевой культурой, имеющее большое хозяйственное значение. При выращивании клубней в промышленных масштабах надземная часть (трава) служит отходом производства. Учитывая её значительную биомассу и малую изученность химического состава, трава топинамбура представляет интерес для более детального исследования как перспективный источник получения БАВ, обладающих фармакологической активностью (Рисунок 3).

	Надземная часть (трава)	Экстракт сухой	Фармацевтическая субстанция иммуномодулирующего действия
	Подземная часть (клубни)	БАД, пищевые продукты	Источник инулина

Рисунок 3 – Принципиальная схема комплексного использования топинамбура

Разрабатываемые согласно предлагаемому подходу профилактические и лечебные средства из цикория обыкновенного и топинамбура будут способствовать расширению номенклатуры эффективных препаратов отечественного производства, что отвечает основным направлениям стратегии инновационного развития фармацевтической отрасли. Наряду с этим, технологии безотходной переработки растений дадут возможность минимизировать затраты на промышленное производство лекарственных средств, что, в свою очередь повысит доступность инновационных препаратов для широкого круга пациентов и будет способствовать увеличению продолжительности и повышения качества жизни населения Российской Федерации.

3.Фитохимическое и фармакогностическое исследование цикория обыкновенного

Сравнительное изучение химического состава травы дикорастущего и листьев культивируемого растения

Согласно данным литературы основными биологически активными веществами надземной части цикория являются низкомолекулярные метаболиты, преимущественного фенольного характера. В связи с этим для характеристики их качественного состава нами использован метод ВЭЖХ-

УФ-МС/МС, позволяющий идентифицировать гидрофильные вещества в извлечении из сырья по специфичным фрагментам ионного распада молекул, а также характеристикам УФ-спектра.

Характер спектральных кривых и положение максимумов поглощения основных пиков веществ на хроматограмме свидетельствовал о наличии веществ фенольного характера: оксикумаринов, гидроксикоричных кислот и флавоноидов (Рисунок 4).

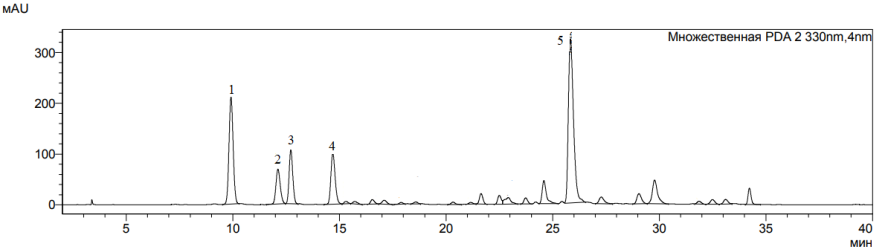


Рисунок 4 – ВЭЖХ-УФ-хроматограмма (330 нм) извлечений из травы цикория обыкновенного дикорастущего: 1– эскулетин, 2 – кафтаровая кислота, 3 – хлорогеновая кислота, 4 – цикориин, 5 – цикориевая кислота

В результате анализа масс-спектров соединений установлено, что в траве дикорастущего цикория обыкновенного преобладающими метаболитами являются эскулетин, цикориин, цикориевая, хлорогеновая и кафтаровая кислоты. Для подтверждения наличия данных соединений проведено их выделение из сырья и установление их структуры метод ЯМР-спектроскопии.

Выделение проводили из фракций экстракта дикорастущего растения, содержащих целевые вещества. Для этого использовали колонки с полиамидом. Элюирование веществ осуществляли смесью растворителей вода-метанол с постепенным увеличением концентрации последнего (от 0 до 100 %). Фракции отбирали по 20 мл и анализировали методом ТСХ на пластинках Sorbfil ПТСХ-ПА-УФ в системе растворителей бутанол-муравьиная кислота-вода (4:1:5). Целевые фракции объединяли, упаривали досуха и рехроматографировали на колонках с силикагелем, используя в качестве элюента смесь растворителей хлороформ-метанол с увеличением градиента последнего. Рехроматографию повторяли до максимального отделения целевых веществ от примесей. Полученные индивидуальные соединения перекристаллизовывали определяли температуру плавления и анализировали методом ЯМР-спектроскопии и ВЭЖХ-УФ.

Эскулетин. В спектре эскулетина (раствор в ДМСО) сигналы винильных протонов проявляются в виде дублетов с константой взаимодействия 9,5 Гц при 6,14 (Н-3) и 6,84 (Н-4) м.д., синглеты при 6,73 и 6,96 м.д. относятся к протонам Н-5 и Н-8 соответственно. Фенольные гидроксильные группы дают сигналы в виде синглетов при 9,44 (ОН-6) и при 10,28 (ОН-7) м.д.

Цикориин. В спектре цикориина (раствор в ДМСО) сигналы винильных протонов проявляются в виде дублетов (константа взаимодействия 9,5 Гц) при 6,29 (Н-3) и 7,92 (Н-4) м.д., синглеты при 6,73 и 6,96 м.д. относятся к протонам Н-5 и Н-8 соответственно. Сигнал при 8,99 м.д. относится к фенольной гидроксильной группе ОН-6. Сигнал Н-1' глюкозы проявляется при 5,08 м.д. (д; 2,8). Другие СН и CH_2 группы дают сигналы в области 3,1-3,8 м.д. Гидроксильные протоны глюкозного фрагмента дают сигналы при 4,92; 5,12 и 5,36 м.д. Сигнал протона ОН-6' гидроксильной в виде триплета с уширенными компонентами (константа взаимодействия с протонами метиленовой группы 3,6 Гц) проявляется при 4,64 м.д.

Цикориевая кислота. Вследствие симметрии молекулы цикориевой кислоты в спектре ^{1}Н-ЯМР-сигналы протонов двух остатков кофейной кислоты, а также четырех протонов фрагмента винной кислоты совпадают. В спектре (в растворе ДМСО) представлены сигналы в виде дублетов при 6,37 и при 7,54 м.д. (КССВ = 15,9 Гц) относятся к винильным протонам Н-7 и Н-8 соответственно. Ароматические протоны дают сигналы при 6,78 м.д. (Н-5, д, КССВ = 8,7 Гц), при 7,08 м.д. (Н-6, дд, 8,7 и 2,1) и при 7,10 м.д. (Н-2, с. уширенный). Фенольные гидроксильные группы дают два сигнала в виде уширенных синглетов при 9,20 м.д. (ОН-3) и при 9,73 (ОН-4). Протоны Н-2' и Н-3'дают сигнал в виде синглета при 5,68 м.д. Карбоксильные группы дают один сигнал (13,6 м.д.).

Кафтаровая кислота. В спектре кафтаровой кислоты (в растворе CD_3OD) сигналы в виде дублетов при 6,32 м.д. (константа взаимодействия 15,8Гц) и при 7,54 м.д. (д; 15,8) относятся к винильным протонам Н-7 и Н-8 соответственно. Ароматические протоны дают сигналы при 6,76 м.д. (Н-5, д; 8,1), при 6,95 м.д. (Н-6, дд; 8,6 и 2,2) и при 7,05 м.д. (Н-2, д; 2,2). Протоны Н-2' и Н-3'остатка винной кислоты дают сигналы при 5,48 м.д. (д; 2,2) и при 4,61 м.д. (д;2,2) соответственно.

Хлорогеновая кислота. В спектре хлорогеновой кислоты (в растворе ДМСО) сигналы в виде дублетов при 6,37 (д;15,8) и при 7,54 м.д. (д: 15,8) относятся к винильным протонам Н-7 и Н-8 соответственно. Ароматические протоны дают сигналы при 6,75 м.д. (Н-5, д; 8,1), при 6,97 м.д. (Н-6, д. уширенный; 8,1) и при 7,02 м.д. (Н-2, с. уширенный). Фенольные гидроксильные группы дают два сигнала в виде уширенных синглетов при 9,15 м.д. (ОН-3) и при 9,59 (ОН-4). Сигналы остатка хинной кислоты дают четырехпротонный сигнал (две метиленовые группы) в области 1,7-2,2 м.д., три сигнала с химическими сдвигами (хс) 4,77; 4,93 и 5,05 м.д. относятся к СН протонам, а три сигнала с значениями хс 3,55; 3,91 и 5,53 м.д. относятся к протонам гидроксильных групп. Карбоксильная группа дает сигнал при 12,39 м.д.

Таким образом, подтверждена структура основных соединений надземной части цикория обыкновенного. Индивидуальные вещества,

полученные в результате проведенного исследования, использованы нами в дальнейшей работе в качестве стандартных образцов для оценки их содержания в сырье, экстрактах и фракциях изучаемого сырья.

В отличие от травы дикорастущего растения, надземная часть культивируемого представлена только листьями корневой розетки. При исследовании хроматограмм извлечений из данного сырья, было установлено, что качественный состав гидроксикоричных кислот и флавоноидов схожий с травой дикорастущего цикория, однако характеризуется меньшим разнообразием. Отличительной особенностью листьев является присутствие оксикумаринов в следовых количествах (Рисунок 5).

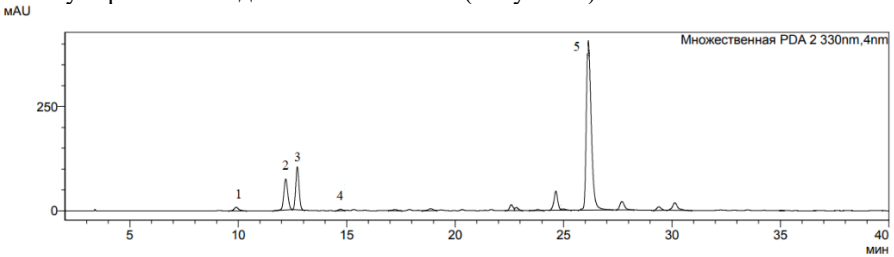


Рисунок 5 – ВЭЖХ-УФ-хроматограмма извлечения из листьев культивируемого цикория обыкновенного (330 нм): 1 – эскулетин, 2 – кафтаровая кислота, 3 – хлорогеновая кислота, 4 – цикориин, 5 – цикориевая кислота

Определение основных БАВ и изучение их накопления в растении

Фракционирование суммарного экстракта. Определение основных действующих веществ

Для обоснования выбора методики стандартизации травы цикория обыкновенного нами проведены исследования по определению групп БАВ, вносящих основной вклад в фармакологический эффект субстанций на её основе. Для этого получены этилацетатная (ЭА), бутанольная (БУ), спиртовая (СП) и водная (ВО) фракции.

Фитохимический анализ метаболитов полученных фракций проводили методом ВЭЖХ-УФ, ВЭЖХ-УФ-МС/МС, СФМ. Наряду с этим, методом кулонометрии изучали антиоксидантные свойства фракций и их влияние на ферменты печени (глутатионтрансферазу и систему цитохрома Р450). В опытах *in vivo* оценивали влияние фракций экстракта листьев культивируемого цикория на иммунный ответ.

В результате проведенного исследования в траве дикорастущего растения обнаружено более 160 веществ, из которых идентифицировано 29.

Учитывая, что в настоящее время всё большее внимание ученые уделяют исследованиям по изучению роли свободных радикалов в возникновении и развитии патологических процессов в организме человека, нами было

проведено изучение антиоксидантной активности полученных фракций в сравнении с суммарным экстрактом травы дикорастущего цикория обыкновенного.

В результате установлено, что наибольшей активностью обладает этилацетатная фракция, при этом её массовая доля в суммарном экстракте самая незначительная. Данная фракция является наиболее представительной по составу веществ и включает гидроксикоричные кислоты, оксикумарины и агликоны флавоноидов. Вероятно, именно суммарный эффект фенольных соединений, сконцентрированных в этилацетатный фракции обуславливает столь значительную антиоксидантную активность.

Наряду с этим, изучение гепатопротекторных и детоксицирующих свойств полученных фракций с применением биотест-систем на основе ключевых ферментов биотранформации и детоксикации в условиях опытов *in vitro* показало, что все фракции в большей или меньшей степени увеличивают скорость реакции коньюгации с участием глютатиотрансферазы, а также активируют детоксицирующую функцию системы цитохрома Р450. Однако наибольшей активностью обладают водная и бутанольная фракции Сопоставляя результаты изучения биологической активности и химического состава фракций, можно предположить, что основной вклад в гепатопротекторный эффект экстракта травы цикория обыкновенного вносят гидроксикоричные кислоты, в частности цикориевая и хлорогеновая, содержание которых в данных фракциях наибольшее (Таблица 1).

Таблица 1 – Характеристика фракций травы цикория обыкновенного дикорастущего

Определяемый показатель	Суммарный экстракт	Этилацетатная фракция	Бутанольная фракция	Спиртовая фракция	Водная фракция
Массовая доля, %	100	11,24	15,25	20,0	53,21
Эскулетин, %	0,40±0,02	4,38±0,18	0,83±0,03	0,88±0,04	0,00
Цикориин, %	1,40±0,06	4,05±0,16	5,25±0,26	0,26±0,01	0,16±0,01
Цикориевая кислота, %	2,52±0,10	1,24±0,04	3,74±0,15	0,53±0,04	3,98±0,16
Кафтаровая кислота, %	0,18±0,01	0,08±0,01	0,17±0,01	0,09±0,01	0,56±0,02
Хлорогеновая кислота, %	0,17±0,01	5,88±0,24	4,92±0,19	0,53±0,02	0,40±0,02

В сравнении с травой, фракции листьев культивируемого цикория по данным ВЭЖХ-УФ-МС/МС содержат более 120 метаболитов, из которых идентифицировано 34.

В результате исследования иммуномодулирующего действия фракций было установлено, что все фракции в равной степени проявляют данную активность, сопоставимую с суммарным экстрактом, что свидетельствует о вкладе суммы веществ, в том числе нефенольной природы в иммуномодулирующий эффект экстракта листьев цикория. Результаты определения содержания доминирующих БАВ в исследуемых фракциях представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Характеристика фракций листьев цикория обыкновенного культивируемого

Определяемый показатель	Суммарный экстракт	Этилацетатная фракция	Бутанольная фракция	Спиртовая фракция	Водная фракция
Массовая доля, %	100	8,1	23,5	23,3	45,1
Эскулетин, %	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Цикориин, %	0,10±0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
Цикориевая кислота, %	4,49±0,13	0,12±0,01	5,70±0,12	1,47±0,03	3,91±0,08
Кафтаровая кислота, %	1,18±0,04	0,76±0,02	0,18±0,01	0,04±0,01	1,23±0,04
Хлорогеновая кислота, %	2,81±0,08	4,02±0,12	7,78±0,23	0,64±0,02	0,34±0,01

Оценка активности полученных фракций в опытах *in vitro* и *in vivo* показала, что наибольшей активностью обладают фракции, наиболее представительные по составу веществ фенольного характера, основными компонентами которых являются производные гидроксикоричной кислоты. В связи с этим, стандартизацию травы и листьев цикория обыкновенного предложено проводить по сумме фенольных соединений.

Разработка методики количественного определения

Изучение спектра поглощения спиртового извлечения из травы цикория обыкновенного показало, что в диапазоне от 200 до 400 нм, спектр имеет максимум поглощения при длине волны 329±2 нм и 298±2 нм (Рисунок 6). Наличие подобных максимумов характерно для гидроксикоричных кислот и соответствует аналогичному максимумому цикориевой кислоты, являющейся одним из доминирующих метаболитов исследуемого сырья.

Таким образом, в качестве аналитической длины волны предложено использовать 329±2 нм и проводить определение содержания суммы фенольных соединений в пересчете на цикориевую кислоту.

При подборе условий анализа было установлено, что оптимальным является проведение однократной экстракции в течение 60 минут на кипящей

алодяной бане в соотношении сырье-экстрагент 1:100, с использованием в качестве экстрагента спирта этилового 70 %.

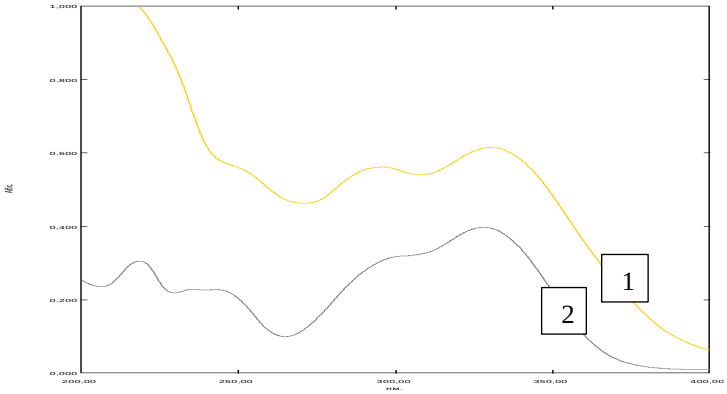


Рисунок 6 – Спектры поглощения извлечения из травы цикория обыкновенного (1) и раствора СО цикориевой кислоты (2)

На основе подобранных условий анализа разработана и валидирована методика количественного определения суммы фенольных соединений (Таблица 3).

Таблица 3 – Валидационные параметры методики

Наименование параметра	Критерий приемлемости
Контроль специфичности	Испытуемый раствор (3 опытных партий): 327, 329, 330 нм; раствор СО цикориевой кислоты: 329 нм
Контроль линейности	Коэффициент корреляции не менее 0,9999
Контроль правильности	Диапазон процента восстановления – от 96,41 % до 102,75 %
Контроль повторяемости	Относительное стандартное отклонение (RSD), % составляет 4,33 %
Контроль внутрилабораторной прецизионности	Совпадение результатов между двумя аналитиками 98 %.
Контроль аналитической области	Правильность, линейность и прецизионность установлены внутри аналитической области от 2 до 6 %

С использованием данной методики было изучено распределение фенольных соединений в различных частях растения, динамика их накопления в процессе онтогенеза, а также проведен анализ сырья, заготовленного в

различных местах произрастания дикорастущего растения и сортовых культур культивируемого растения.

Накопление фенольных соединений в различных частях растения

В результате проведенного исследования было показано, что наибольшее количество фенольных соединений (7,19±0,33) % накапливается в стеблевых листьях, при этом доминирующим соединением этой части растения является цикориевая кислота (3,91±0,12) %. В цветках также установлено значительное содержание фенольных веществ (3,74±0,17) %, среди доминирующих соединений отмечено сравнительно высокое количество оксикумаринов – эскулетина и цикориина (Таблица 4).

Таблица 4 – Содержание биологически активных веществ в различных частях цикория обыкновенного дикорастущего

Определяемый показатель	Цветки	Цветонос-ные стебли	Стеблевые листья	Стебли	Трава
Сумма фенольных соединений, %	3,74±0,17	2,25±0,10	7,19±0,33	1,00±0,046	2,02±0,09
Эскулетин, %	0,03±0,01	0,01±0,003	0,00	0,00	0,01±0,001
Цикориин, %	0,25±0,00	0,05±0,0	0,02±0,00	0,00	0,06±0,01
Цикориевая кислота, %	1,04±0,03	1,04±0,03	3,91±0,12	0,55±0,02	1,50±0,05
Кафтаровая кислота, %	0,10±0,01	0,06±0,002	0,21±0,006	0,02±0,01	0,08±0,002
Хлорогеновая кислота, %	0,49±0,01	0,28±0,008	0,98±0,03	0,15±0,01	0,29±0,009

Несмотря на то, что в фазу цветения в листьях цикория обыкновенного накапливается больше фенольных соединений, чем в траве, в качестве сырья целесообразно заготавливать траву, что обусловлено почти в 2 раза большей урожайностью травы по сравнению с листьями.

Накопление фенольных соединений в процессе онтогенеза растения

На основании полученных данных установлено, что заготовку сырья целесообразно проводить в фазу бутонизации, цветения и конца вегетации (Таблица 5).

Из данных таблицы следует, что наибольшее содержание фенольных соединений наблюдается в фазу конца вегетации, при этом кумарины (эскулетин и цикориин) начинают обнаруживаться в фазу бутонизации. Вероятно, это связано с накоплением данных соединений только в цветках цикория.

Таблица 5 – Содержание фенольных соединений в зависимости от фазы вегетации растения

Определяемый показатель	Фаза ветвления	Фаза бутонизации	Фаза массового цветения	Фаза конца вегетации
Сумма фенольных соединений, %	1,52±0,05	3,63±0,17	3,01±0,14	4,33±0,20
Эскулетин, %	0,00	0,00	0,01±0,001	0,01±0,001
Цикориин, %	0,00	0,02±0,01	0,06±0,01	0,05±0,01
Цикориевая кислота, %	0,90±0,01	1,20±0,03	1,50±0,05	1,47±0,04
Кафтаровая кислота, %	1,01±0,005	0,09±0,01	0,08±0,002	0,07±0,002
Хлорогеновая кислота, %	0,41±0,006	0,28±0,01	0,20±0,009	0,29±0,009

Накопление фенольных соединений в зависимости от места произрастания растений

Исследование проводили с 2015 по 2021 год. Все образцы сырья были собраны в фазу массового цветения и высушены воздушно-теневым способом. Анализ 41 образца травы дикорастущего цикория обыкновенного различных мест произрастания и годов заготовки, показал, что содержание суммы фенольных соединений колеблется в пределах от 1,95 до 6,25 %. При этом хроматографический профиль характеризуется единообразием и наличием основных пиков веществ: эскулетина, цикориина, цикориевой, хлорогеновой и кафтаровой кислот; отличительными признаками является различное соотношение интенсивностей пиков данных веществ. Полученные результаты позволили регламентировать норму содержания фенольных соединений в траве цикория обыкновенного на уровне не менее 2 %.

Выбор режима сушки сырья

По результатам проведенного исследования установлено, что сушка при температуре более 40 ºС приводит к значительному снижению содержания гидроксикоричных кислот, особенно, цикориевой кислоты (на 46 %). Влияние солнечного света при сушке на открытом воздухе приводит к изменению цвета сырья, а также снижению содержания оксикумаринов (эскулетина и цикориина), более чем в 2 раза. Нагревание сырья до 60 °С позволяет ускорить время сушки, однако, при этом наблюдается процесс разрушения гидроксикоричных кислот и, как следствие, снижение содержания цикориевой кислоты в 3 раза, хлорогеновой – в 5, кафтаровой – в 2 раза) по сравнению с сушкой при 40 ºС (Таблица 6).

Таблица 6 - Влияние режима сушки травы цикория обыкновенного на содержание фенольных соединений

Режим сушки	Сумма фенольных соединений, %
Камерная сушка 60 °С. Измельченная трава	1,26±0,06
Камерная сушка 60 °С. Цельная трава	1,40±0,07
Сушка на солнце. Измельченная трава	2,63±0,12
Сушка на солнце. Цельная трава	3,01±014
Сушка 40 °С без доступа света. Цельная трава	3,63±0,17
Сушка 40 °С без доступа света. Измельченная трава	3,32±0,16

Таким образом, оптимальным режимом сушки, позволяющими максимально сохранить фенольные соединения, является высушивание сырья при температуре не выше 40 ºС без доступа солнечного цвета. Полученные данные положены в основу составления «Инструкции по сбору и сушке травы дикорастущего цикория обыкновенного».

Определение показателей качества и разработка нормативной документации на траву и листья цикория обыкновенного

Определение показателей качества травы цикория обыкновенного и установление их норм проводили на основании анализа пяти опытных партий сырья, заготовленных в различных регионах РФ, а также трёх опытных партий листьев культивируемых растений. В результате проведенных исследований составлено описание внешних признаков, выявлены диагностические признаки в анатомическом строении, определены нормы числовых показателей для сырья дикорастущего и культивируемого растения.

Внешние признаки травы дикорастущего растения. Смесь кусков олиственных и безлистных стеблей, листьев и цветков. Стебли округлые, ребристые, голые или опушенные, длиной до 15 см, диаметром до 0,5 см. Стеблевые листья очередные, сидячие, стеблеобъемлющие с закругленными или стреловидными ушками, ланцетно-яйцевидные или ланцетные; верхние цельнокрайние, нижние острозубчатые. Листья более или менее опушенные. Соцветия – корзинки одиночные или собраны по нескольку в пазухах листьев или на верхушке стеблей. Цветки язычковые, пятизубчатые, обоеполые. Обвертка корзинки двухрядная, наружные листочки в 1,5-2 раза короче внутренних, неодинаковой формы, сверху опушенные железистыми волосками. Цвет листьев и стеблей от зеленого до коричневато-зеленого; венчиков сине-фиолетовый, иногда голубой или розоватый (Рисунок 7).

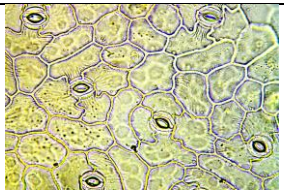
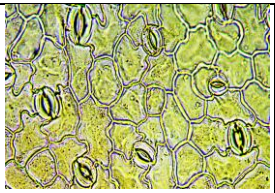
Рисунок 7 – Трава дикорастущего (1) и листья культивируемого (2) цикория обыкновенного

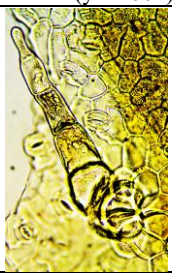
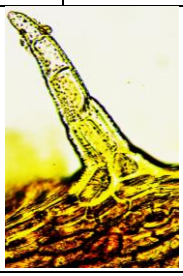
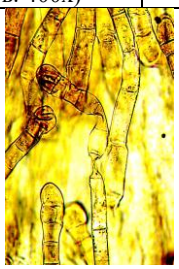
Внешние признаки листьев культивируемого растения. Прикорневые розеточные листья струговидно перисторазделные или цельные, по краю зубчатые, к основанию постепенно суженные в крылатый черешок, с заостренной или притупленной верхушкой, с хорошо заметной с обеих сторон главной жилкой, вдавленной сверху и выступающей снизу, шершавые, ломкие, частично скрученные. Длина листа с черешком до 32 см, ширина до 7 см. Цвет листьев зеленый, серовато-зеленый или коричневато-зеленый. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый.

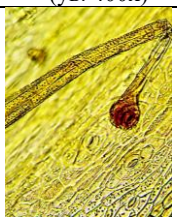
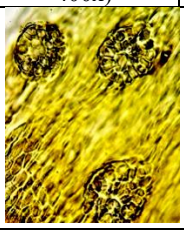
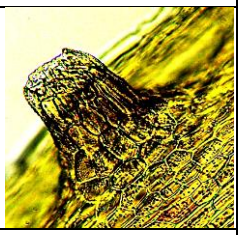
Микроскопические признаки травы дикорастущего растения. При рассмотрении листа с поверхности клетки верхнего эпидермиса с прямыми и слабоизвилистыми стенками, нижнего – со слабоизвилистыми и извилистыми. Кутикула продольно морщинистая, около устьиц лучисто-морщинистая, местами стенки клеток четковидно утолщены. Устьица с обеих сторон листа, овально-округлые, окружены 3-6 околоустьичными клетками (аномоцитный тип). На обеих сторонах листа, чаще по жилкам и по краю, расположены простые многоклеточные волоски, одно- и многорядные с бородавчатой и гладкой поверхностью, нередко они имеют клетки со спавшимися стенками и могут быть обломаны. Вокруг волосков клетки эпидермиса часто образуют розетку. При опадении волосков хорошо заметны места их прикрепления. По краю листа волоски толстостенные и более короткие. Встречаются железистые волоски на многоклеточной, нередко двух-, трехрядной ножке с многоклеточной головкой (Рисунок 8).

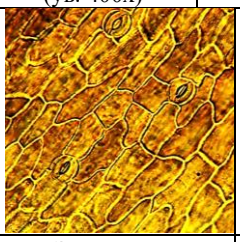
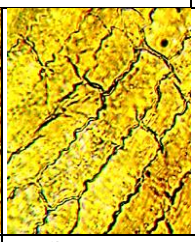
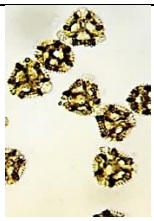
Клетки эпидермиса стебля, слегка вытянутые по его длине с прямыми стенками, продольно складчатой кутикулой, устьицами аномоцитного типа. Встречаются волоски такого же строения как на листе.

Эпидермис листочка обвертки с внутренней стороны состоит из вытянутых клеток с прямыми и слабоизвилистыми стенками, с наружной стороны – из многоугольных клеток с прямыми стенками (в основании) и с прямыми и слабоизвилистыми стенками (в средней части).

		
Верхний эпидермис листа (ув. 400х)	Нижний эпидермис листа (ув. 400х)	Кутикула (ув. 400х)

			
Простые многоклеточные волоски (ув. 400х)	Простые волоски по краю листа (ув. 400х)	Головчатые волоски (ув. 400х)	Места прикрепления волосков (ув. 400х)

			
Эпидермис стебля (ув. 400х)	Железистые волоски: (ув. 200х)	Места прикрепления волосков (200х)	Обломки волосков (ув. 200х)

			
Эпидермис внутренней стороны листочка обвертки (ув. 400х)	Эпидермис язычкового цветка (ув. 400х)	Простые нитевидные волоски на верхушке и по краю зубчика (ув. 200х)	Пыльца (ув. 400х)

Рисурнок 8 – Микроскопические признаки травы цикория обыкновенного

Устьица с обеих сторон аномоцитного типа. По жилкам встречаются железистые волоски с многоклеточной головкой на многоклеточной двух-, трехрядной ножке, нередко волоски обломаны. На верхушках зубцов и по краю листочках обвертки расположены 1-5-клеточные нитевидные и остроконусовидные 1-3-клеточные простые волоски и сосочковидные выросты.

При рассмотрении язычкового цветка видны вытянутые по длине клетки эпидермиса с прямыми, слабоизвилистыми (у основания) и извилистыми стенками и складчатостью кутикулы. На поверхности с обеих сторон многочисленные тонкостенные многоклеточные простые и головчатые волоски с одно-, реже двухрядным основанием, нередко со спавшимися стенками клеток; головчатые волоски с многоклеточной головкой. На верхушках зубцов расположены простые, головчатые волоски и сосочковидные выросты. Пыльца округлая, округло-трехгранная шиповатая трехпоровая.

*Микроскопические признаки листа культивируемого растения***.** При микроскопическом исследовании листа культивируемого цикория выявлены дигностические признаки аналогичные листу дикорастущего растения.

Определение основных биологически активных веществ

Для подтверждения подлинности травы цикория обыкновенного нами выбран метод хроматографии в тонком слое сорбента, наиболее широко представленный в фармакопейных статьях на лекарственное растительное сырьё в ГФ РФ XIV издания. При этом для травы дикорастущего растения использованы стандартные образцы цикориевой кислоты и эскулетина, тогда как для листьев культивируемого растения – только СО цикориевой кислоты.

В соответствии с требованиями ГФ РФ и с учетом результатов анализа опытных партий сырья дикорастущего цикория обыкновенного предложена следующая номенклатура числовых показателей и нормы: влажность не более 13 %; зола общая не более 14 %; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте не более 2 %; сырьё, изменившее окраску (потемневшие, побуревшие) не более 5 %; стебли, в том числе отделенные при анализе не более 65 %; органическая примесь не более 3 %; минеральная примесь не более 1 %. Для листьев культивируемого растения предложена следующая номенклатура числовых показателей: влажность не более 13 %; зола общая не более 14 %; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте не более 2 %; сырьё, изменившее окраску (потемневшие, побуревшие) не более 5 %; органическая примесь не более 3 %; минеральная примесь не более 1 %.

По показателям безопасности, таким как «Тяжелые металлы и мышьяк», «Радионуклиды», «Остаточные количества пестицидов» все опытные партии сырья дикорастущих и культивируемых растений отвечали требованиям соответствующих ОФС.

По результатам проведенных исследования разработаны проекты фармакопейных статей «Цикория обыкновенного трава» и «Цикория обыкновенного листья».

Сравнительное изучение химического состава корней дикорастущего и культивируемого растения

С использованием метода ВЭЖХ-УФ-МС/МС в экстракте корней дикорастущего растения определено наличие 21 вещества, из которых идентифицированы 14, в культивируемом - 16. Среди метаболитов определены вещества, относящиеся к сесквитерпеновым лактонам (цикориозид В, цикориозид С, лактуцин, лактупикрин, крепидиазид Б, сончузид А и их изомеры) и гидроксикоричным кислотам (хлорогеновая, дикофеоилхинная кислоты и их изомеры). Анализируя полученные данные, можно сделать вывод о схожести качественного состава метаболитов корней дикорастущего и культивируемого растения.

Результаты оценки содержания основных групп БАВ показали, что в корнях культивируемых растений преобладают фруктозаны, тогда как в сырье дикорастущих растений наблюдается большее содержание фенольных соединений.

Определение основных БАВ и оценка их содержания в сырье

Для выявления основных групп БАВ, отвечающих за фармакологическое действие, нами было проведено фракционирование экстрактов корней культивируемых и дикорастущих растений (Таблица 7).

Таблица 7 – Соотношение фракций в экстрактах корней культивируемых растений

Корни	Массовая доля фракций в экстракте, %		
	Бутанольная	Спиртовая	Водная
Дикорастущие растения	32,46	13,64	53,90
Культивируемые растения	3,37	16,76	79,87

В результате исследования фракций в опытах *in vivo* на модели токсического гепатита, установлено, что наибольшей активностью обладает бутанольная фракция. Анализ качественного состава данной фракции показал, что основными её компонентами являются производные гидроксикоричных кислот и сесквитерпеновые лактоны.

Определение показателей качества корней цикория обыкновенного

Фармакогностическое исследование корней, установление норм числовых показателей проводили на образцах корней дикорастущих и культивируемых растений.

Внешние признаки корней Цельное сырье. Цельные корни различной длины, толщиной в верхней части до 1 см, ветвистые (дикорастущее сырье) и до 3 см, неразветвленные (культивируемое сырье), стержневые, снаружи продольно-морщинистые, иногда спирально-перекрученные, твердые, в изломе неровные. В центре корня видна желтоватая древесина, окруженная серовато-белой или белой корой, в которой (под лупой) заметны радиальные ряды млечников. Цвет корней снаружи от светло-коричневого до темно-коричневого. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый.

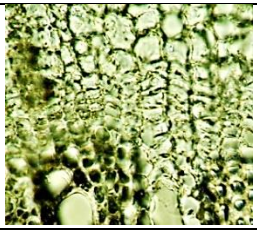
Резаное сырье (культивируемых растений). Кусочки корней, разрезанных поперек, толщиной до 0,7 см, с продольно-морщинистой наружной поверхностью, частично скрученные, встречаются цилиндрические кусочки корней. В центре видна желтоватая древесина, окруженная серовато-белой или белой корой, в которой (под лупой) заметны радиальные ряды млечников. Цвет кусочков корней снаружи от светло-коричневого до темно-коричневого. Запах слабый. Вкус водного извлечения горьковатый (Рисунок 9).

Рисунок 9 – Корни цикория обыкновенного дикорастущего цельные (1), культивируемого резаные (2)

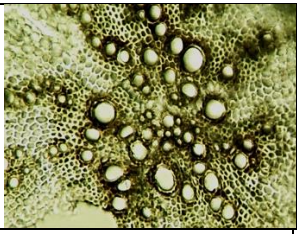
*Микроскопические признаки корней***.** При рассмотрении поперечного среза видно, что корень имеет вторичное строение. Поверхность корня покрыта многорядной пробкой коричневого цвета. Кора широкая, представлена овальными тонкостенными клетками паренхимы, в которой проходят многочисленные млечники, образующие вместе с группами проводящих элементов луба радиальные прерывистые ряды. Млечники заполнены желтовато-коричневым содержимым. Луб отделен от древесины линией камбия. Древесина состоит из крупных сосудов, паренхимы, небольшого количества трахеид, волокон. Сосуды расположены преимущественно в радиальных группах, при рассмотрении в продольном сечении имеют простую перфорацию – лестничные, сетчатые, с окаймленными порами. В центре корня находится первичная ксилема. Сердцевинные лучи одно- и многорядные. В клетках коровой паренхимы и

паренхимы древесины содержится инулин в виде бесцветных комочков и глыбок. Корни культивируемых растений отличаются более мощным развитием паренхимы не только в коре, но и в древесине (Рисунок 10).

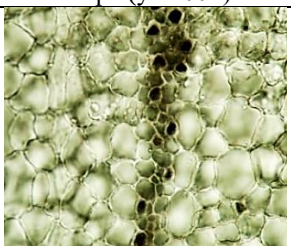
Радиальные ряды млечников во вторичной коре (ув.200х)



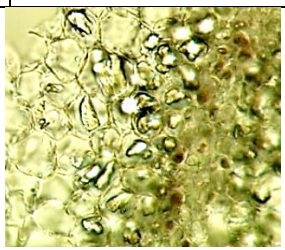
Область камбия (ув.200х)



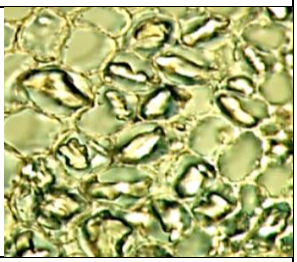
Первичная ксилема в центре корня (ув.200х)



Млечники во флоэме (ув.400х);



Млечники и глыбки инулина в паренхиме (ув.400х)



Инулин в клетках коровой паренхимы (ув.400х);

Рисунок 10 – Поперечный срез корня цикория обыкновенного

Для оценки содержания фенольных соединений была использована методика, разработанная для анализа травы этого растения и адаптированная к условиям анализа корней.

В свою очередь, согласно требованиям ГФ РФ, заготовка корней рекомендована либо ранней весной, либо поздней осенью. Учитывая, биологические особенности и места произрастания дикорастущего цикория осуществить заготовку корней в промышленных масштабах не представляется возможным. Поскольку идентифицировать растение в данные периоды среди другого полевого разнотравия довольно сложно, ввиду отсутствия характерных цветущих побегов.

В связи с этим, в качестве сырья предпочтительнее использование корней культивируемых растений, выращивание которых осуществляется на промышленных плантациях, а заготовка ведётся по средствам механизированной уборки в конце первого года вегетации растения.

4.Фитохимическое и фармакогностическое исследование травы топинамбура

На основании анализа данных литературы в рамках поставленных задач в качестве объекта исследования нами выбран топинамбур, вид семейства Астровых, имеющий общность биологических признаков с видом цикория обыкновенного.

Фитохимическое исследование травы топинамбура

В результате проведенного исследования методом ВЭЖХ-УФ-МС/МС установлено наличие 42 веществ, из которых идентифицировано 18, представленных гидроксикоричными кислотами (хлорогеновой, неохлорогеновой, изохлорогеновой А, В, С, кофейной, феруловой, изомерами кофеоилхинной, кумароилхинной кислот) и флавоноидами (гликозидами кверцетина, кемпферола/лютеолина, изорамнетина). Хроматограмма и доминирующие соединения представлены на рисунке 11.

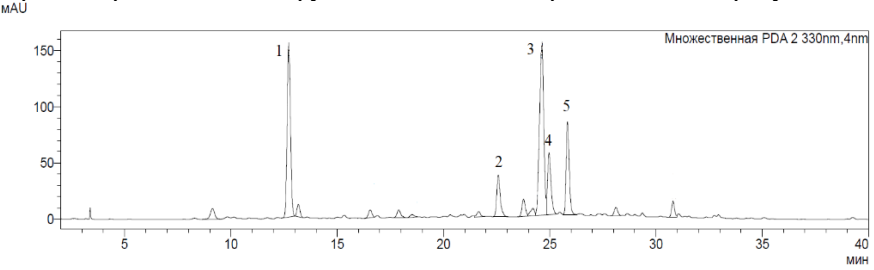


Рисунок 11 – ВЭЖХ-УФ-хроматограмма (330 нм) извлечения из травы топинамбура: 1 – хлорогеновая кислота, 2 – кверцетин-глюкуронид, 3 – изохлорогеновая А кислота, 4 – лютеолин/кемпферол-глюкуронид, 5 – изохлорогеновая С кислота

При изучении УФ-спектра водно-спиртового извлечения из травы топинамбура было установлено, в диапазоне длин волн 200 – 400 нм наблюдается максимум при 327±2 нм (Рисунок 12).

Характер спектральной кривой и положение максимума свидетельствует о доминировании гидроксикоричных кислот. В связи с этим, для количественной оценки суммы фенольных соединений в данном сырье выбран метод прямой спектрофотометрии. В качестве стандартного образца использована хлорогеновая кислота, идентифицированная нами в траве топинамбура и являвшаяся одним из доминирующих её метаболитов.

В ходе дальнейших исследований по аналогии с травой цикория обыкновенного, были подобраны оптимальные условия анализа и разработана методика количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту.

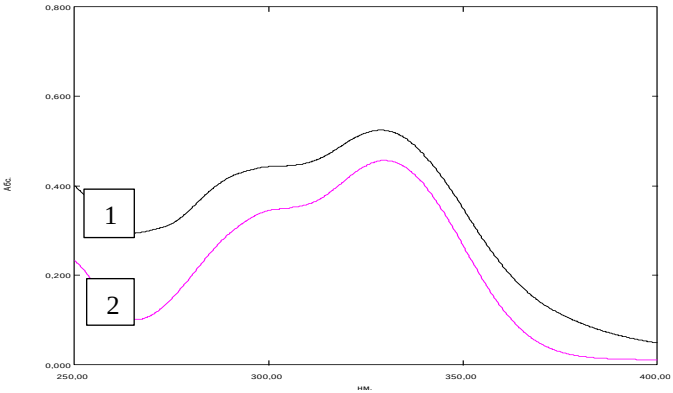


Рисунок 12 – УФ-спектр поглощения извлечения из травы топинамбура (1) и хлорогеновой кислоты (2)

Проведенная валидация позволила охарактеризовать разработанную методику положительно по основным аналитическим параметрам (Таблица 8).

Таблица 8 – Валидационные параметры методики

Наименование параметра	Критерий приемлемости
Контроль специфичности	Испытуемый раствор (3 опытных партий): 327, 325, 328 нм; раствор СО хлорогеновой кислоты: 327 нм
Контроль линейности	Коэффициент корреляции не менее 0,993
Контроль правильности	Диапазон процента восстановления – от 97,1 % до 103,2 %
Контроль повторяемости	Относительное стандартное отклонение (RSD), % составляет 4,2 %
Контроль внутрилабораторной прецизионности	Совпадение результатов между двумя аналитиками 98 %.
Контроль аналитической области	Правильность, линейность и прецизионность установлены внутри аналитической области от 5 до 12 %

Изучение накопления БАВ в образцах травы топинамбура, заготовленных в различных местах произрастания, показало, что содержание фенольных соединений составляет от (4,88±0,22) % до (11,45±0,54) %, хлорогеновой кислоты – (0,68±0,03) % до (2,37±0,08) %. При этом в образцах, заготовленных осенью содержание хлорогеновой кислоты повышается, тогда как значения суммы фенольных веществ в целом снижается (Таблица 9).

Таблица 9 – Накопление фенольных соединений в сырье различных мест произрастания

Место произрастания	Сумма фенольных соединений, %	Хлорогеновая кислота, %
Московская обл., Чеховский район, 2021 г. (осень)	4,88±0,22	1,67±0,05
Московская обл., Пушкинский район, 2021, (осень)	7,47±0,35	2,37±0,08
Башкортостан, г. Уфа, Балтаческий район, 2017 (июль)	9,82±0,46	1,41±0,04
Башкортостан, г. Уфа, Стерлишамокский район, 2017 (июль)	11,18±0,55	0,68±0,03
Тверская область, Скороспелка, листья 2018 (июль)	11,45±0,54	1,93±0,06
Тверская область, Скороспелка, трава 2018 (осень)	5,06±0,24	2,08±0,06

В результате исследования распределения фенольных соединений по органам надземной части растения установлено, что наибольшее количество веществ фенольной природы накапливается в листьях (Таблица 10).

Таблица 10 – Содержание фенольных соединений в надземной части топинамбура

Часть растения	Сумма фенольных соединений, %	Хлорогеновая кислота, %	Массовая доля в составе сырья, %
Стебли до 3 мм	2,85±0,12	0,97±0,03	7,73
Стебли 3-5 мм	2,04±0,09	0,71±0,02	23,36
Стебли более 5 мм	1,57±0,07	0,43±0,01	35,40
Стебли почерневшие	2,15±0,09	0,79±0,24	8,33
Листья	10,07±0,31	2,65±0,08	23,60
Цветки	7,15±0,30	1,93±0,06	1,58
Трава	*7,47±0,31*	*2,37±0,07*	*100*

Содержание в стеблях снижается по мере утолщения стебля, что служит основанием нормирования количества стеблей, диаметром более 5 мм в составе сырья. При этом черная окраска стеблей незначительно влияет на содержание фенольных веществ в целом не требует строго ограничения.

Фармакогностическое исследование травы топинамбура

Для проведения исследования травы топинамбура заготавливали осенью в фазу конца вегетации перед уборкой клубней.

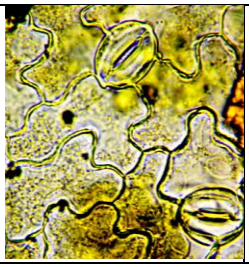
Внешние признаки. Верхние части олиственных стеблей длиной до 50 см или их куски с листьями и цветками, отдельные листья, стебли, цветки. Стебли прямые, в верхней части ветвистые, округлые, продольно-бороздчатые, шершавые от коротких волосков. Листья супротивные, верхние очередные, черешковые, крупно пильчато-зубчатые, сердцевидно-яйцевидные, удлиненно-яйцевидные или ланцетные, с тремя продольными жилками, с обеих сторон шершаво коротко волосистые. Корзинки относительно мелкие 2-5 см в диаметре (иногда больше); обвертка двухрядная, листочки обвертки ланцетные с отогнутой верхушкой, шероховатые или коротко волосистые; прицветники пленчатые трехзубчатые, на верхушке волосистые; краевые цветки язычковые, срединные – трубчатые обоеполые. Цвет стеблей светло-зеленый, иногда с фиолетовым и черным оттенком; листьев с верхней стороны зеленый, с нижней – более светлый; листочков обвертки зеленый; цветков желтый (Рисунок 13).

Рисунок 13 - Травы топинамбура

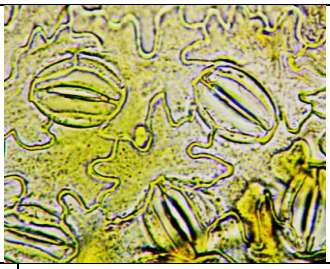
Микроскопические признаки. Для установления диагностических признаков были исследованы микропрепараты листа, стебля, цветка. Наиболее характерные особенности представлены на рисунке 14.

Для подтверждения подлинности травы топинамбура предложено использовать хроматографию в тонком слое сорбента со стандартным образцом хлорогеновой кислоты, как основного вторичного метаболита данного сырья.

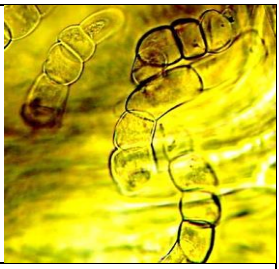
На основании анализа 3 опытных партий травы топинамбура установлены нормы показателей качества сырья. Для оценки содержания БАВ использована разработанная нами методика количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоты методом прямой спектрофотометрии.



Верхний эпидермис листа (ув. 400х)

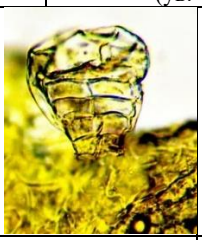


Нижний эпидермис листа (ув. 400х)

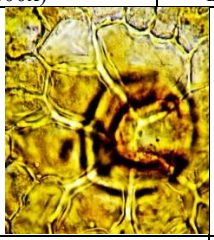


Гусеницеобразные волоски (ув. 400х)

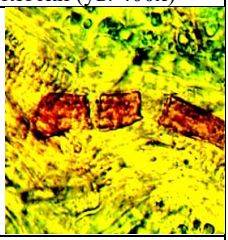
Простые толстостенные волоски (ув. 400х)



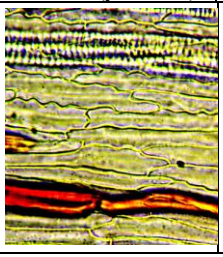
Эфирномасличные железки (ув. 400х)

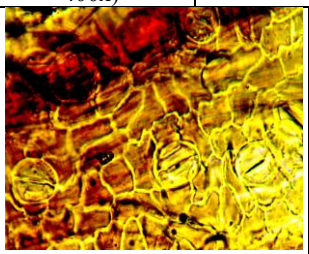


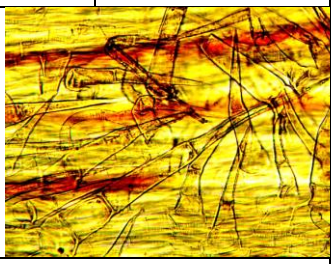
Розетка (ув. 400х)



Секреторные ходы (ув. 400х)

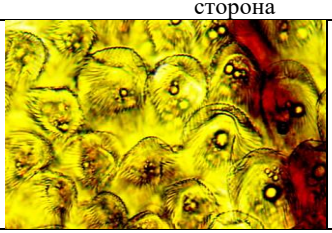




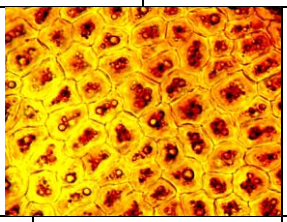


Эпидермис прицветника (ув. 400х): а – внутренняя сторона, б – наружная сторона

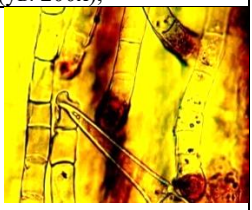
Простые многоклеточные волоски по центральной части прицветника: (ув. 200х),



Внутренний эпидермис венчика трубчатого цветка (ув. 400х)



Эпидермис наружной стороны (ув. 400х)



Волоски на поверхности лепестка (ув. 400х)

Рисунок 14 – Микроскопические признаки травы топинамбура

Учитывая, что траву топинамбура (как вторичное сырьё выращивания клубней) предполагается заготавливать осенью в фазу конца вегетации, то норму по этому показателю предложено установить не менее 4 %.

Наряду с этим предложена номнклатура числовых показателей и их нормы: влажность не более 14 %; зола общая не более 8 %; зола, нерастворимая в хлористоводородной кислоте не более 1 %; стебли, диаметром более 5 мм не более 40 %; органическая примесь не более 1 %; минеральная примесь не более 1 %.

На основании проведенных исследований составлен проект фармакопейной статьи «Топинамбура трава».

5.Разработка способа получения и установление показателей качества стандартных образцов

Современные требования к качеству лекарственных средств обусловливают необходимость использования высокочувствительных физико-химических методов анализа с применением стандартных образцов (СО). Они используются на всех стадиях создания лекарственных средств, включая научно-исследовательские этапы.

Для надлежащего осуществления контроля качества травы и листьев цикория обыкновенного нами разработан способ получения цикориевой кислоты – стандартного образца (СО). Характеристика качества СО проведена по показателям: описание, растворимость, температура плавления, удельный показатель поглощения, потеря в массе при высушивании, посторонние примеси, количественное определение.

Согласно предложенной схеме, была получена хлорогеновая кислота, при этом в качестве сырья использованы стеблевые листья топинамбура – часть растения, содержащая наибольшее количество целевого вещества.

По результатам проведенных исследований оформлены и утверждены технические условия ТУ 72.19.30-001-04868244-2018 «Цикориевая кислота – стандартный образец»; ТУ 72.19.30-004-04868244-2021 «Хлорогеновая кислота – стандартный образец». Срок годности 2 года в упаковке, предусмотренной техническими условиями.

6.Разработка ресурсосберегающих технологий комплексной переработки цикория обыкновенного и топинамбура

В результате проведенного фитохимического исследования, фракционирования и скрининга активности в опытах *in vitro* и *in vivo* было установлено, что фармакологическое действие экстрактов различных частей растений цикория обыкновенного и топинамбура обусловлено наличием комплекса биологически активных веществ. Фракционирование суммарных экстрактов показало, что наибольшей активностью обладают наиболее представительные по химическому составу фракции, при этом зачастую их

действие незначительно превышает или сопоставимо с таковым суммарного экстракта.

В связи с этим, рациональным способом переработки исследуемых растений считаем получение суммарных экстрактов сухих травы, листьев и корней цикория обкыновенного, а также травы топинамбура.

Технологии переработки травы и листьев цикория обыкновенного

Согласно результатам фитохимического изучения надземной части цикория обыкновенного было установлено, что основной группой БАВ, являются фенольные соединения. В ходе разработки технологии получения экстракта сухого из травы цикория обыкновенного были подобраны оптимальные условия, позволяющие максимально извлекать данные вещества из сырья: экстрагент 70 % спирт этиловый, температура 60±5ºС, 3-кратнная экстракция по 2 часа в соотношении сырье-экстрагент 1:12.

Готовый продукт – сухой экстракт травы цикория обыкновенного представляет собой аморфный порошок желто-коричневого цвета со специфическим запахом, гигроскопичен, комкуется. Сыпучесть 2,23±0,02 г/с; угол естественного откоса 33±1° С; насыпная плотность при свободном падении 0,70±0,01 г/см^3, с уплотнением – 1,02±0,02 г/см^3. Содержание суммы фенольных соединений – не менее 8 %.

Исследование фармакологической активности в опытах *in vivo* на модели токсического гепатита, вызванного четырёххлористым углеродом, показало, что цикория обыкновенного травы экстракт сухой в дозе 100 и 500 мг/кг обладает выраженным агепатопротекторным действием, сопоставимым с активностью Силимара®.

При экспериментальном иммунодефиците, вызванном цитостатиком азатиоприном, цикория обыкновенного травы экстракт сухой в дозе 30 мг/кг проявил активность по отношению к реакциям клеточного, гуморального и макрофагального звеньев иммунного ответа. Не изменяя показатели иммунитета интактных животных, данный экстракт способен ослаблять супрессивное действие азатиоприна на клеточно-опосредованную иммунную реакцию, антителогенез и фагоцитоз макрофагов.

Наряду с этим, установлена его антиоксидантная, противовоспалительная, гипохолестеринемическая, желчегонная активность.

Таким образом, травы цикория обыкновенного сухой экстракт представляет собой стандартизованную фармацевтическую субстанцию и может быть использован для получения лекарственных форм.

Рациональность предложенной технологической схемы была подтверждена при получении экстракта листьев культивируемого цикория обыкновенного. По внешнему виду и технологическим характеристикам полученный экстракт не отличается от экстракта, наработанного из травы дикорастущего растения. Однако норма содержания фенольных соединений

для него установлена не менее 10 % ввиду более высокой нормы по этому показателю для листьев по сравнению с травой цикория обыкновенного.

По данным фармакологического исследования цикория обыкновенного листьев экстракт сухой также обладает иммуномодулирующей активностью в аналогичной дозе и оказывает действие на гуморальном, клеточном и макрофагальном уровне иммунного ответа, незначительно превосходя по активности экстракт травы цикория обыкновенного. Такие различия вероятно связаны с бóльшим содержанием фенольных соединений в сырье культивируемых растений.

Технологии переработки корней цикория обыкновенного

На основании результатов фитохимического и фармакогностического исследования было показано, что в качестве лекарственного растительного сырья рационально использовать корни культивируемых растений. Учитывая высокое содержание углеводных компонентов и незначительный вклад в гепатопротекторное действие, нами предложена технология переработки данного сырья, позволяющая получить несколько продуктов (Рисунок 15).

В результате экстрагирования корней спиртом этиловым 70 %, концентрирования и сушки получен сухой экстракт, представляющий собой аморфный порошок светло-коричневого цвета, гигроскопичен. Сыпучесть (с вибрацией) 2,00±0,03 г/с; угол естественного откоса 29±1° С; насыпная плотность при свободном падении 0,69±0,01 г/см^3, с уплотнением – 0,88±0,02 г/см^3. По результатам фармакологического исследования в опытах *in vivo* полученный экстракт показал желчегонное и гепатопротекторное действие.

Шрот, оставшийся после водно-спиртовой экстракции может служить сырьём для получения инулина.

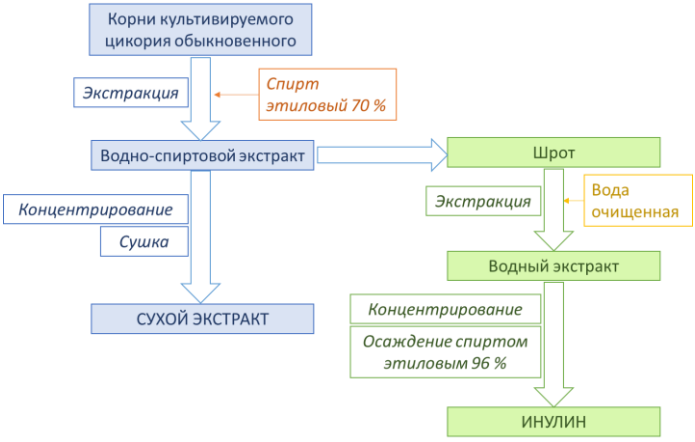


Рисунок 15 – Схема переработки корней цикория обыкновенного

Большинство известных способов получения инулина подразумевают водную экстракцию из корней цикория (или топинамбура) и последующую очистку посредством ионообменных смол и активированного угля.

Предлагаемый нами способ комплексной переработки корней, позволяет получить сухой экстракт и инулин в одной технологической схеме. Экстракция спиртом позволяет извлечь низкомолекулярные соединения и, наряду с получением экстракта сухого, является стадией предварительной очистки сырья для выделения инулина.

Полученный согласно представленной схеме инулин представляет собой аморфный порошок белого с сероватым оттенком цвета. Выход инулина составляет 32,6 % (от шрота). Химическая структура полученного вещества подтверждена методом ЯМР-спектроскопии (Рисунок 16).

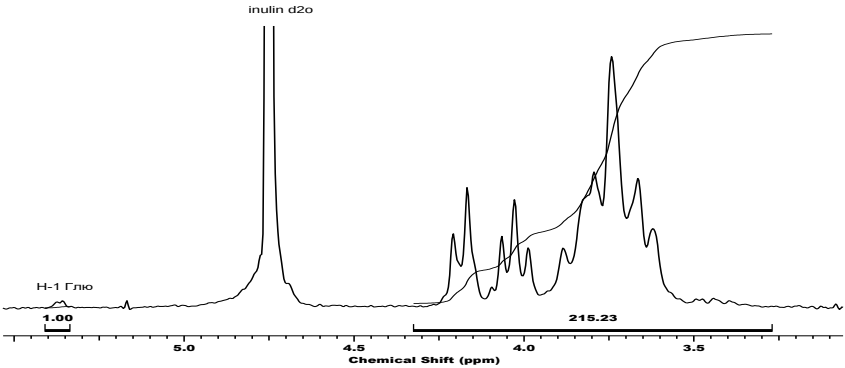


Рисунок 16 – ^{1}H-ЯМР-спектр инулина, выделенного из корней цикория обыкновенного

Спектр ^{1}H-ЯМР раствора инулина в D_2O состоит из спектра одной молекулы остатка глюкозы и n количества мономерных единиц фруктозы.

Сигнал протона H-1 (1H; 6,36, д;2,9) остатка глюкозы находится в области, отдельной от сигналов других протонов инулина (3,5-4,3 м.д.), в которой находятся сигналы всех остатков фруктозы и пять сигналов CH и CH_2 групп глюкозного фрагмента.

Для определения количества мономерных единиц фруктозы в полифруктозане производили интегрирование H-1 сигнала глюкозного фрагмента и сигналов протонов в области 3,5-4,3 м.д.

Учитывая, что вклад в интегральную интенсивность в этой области сигналов вносят семь протонов (два метиленовых и три метиновых протона) мономерной единицы фруктозы, то для нахождения протонной единицы фруктозного фрагмента полученное значение интеграла делили на 7. Согласно полученному спектру, количество мономерных единиц фруктозы для инулина, выделенного из корней цикория, равно 30.

Таким образом, предложенная схема переработки корней культивируемого цикория позволяет получить сухой экстракт низкомолекулярных соединений для последующей разработки на его основе гепатопротекторного средства, а также инулин, который находит широкое применение в пищевой промышленности и в составе биологически активных добавок к пище.

Технология переработки травы топинамбура

Трава топинамбура, являющаяся отходом производства при выращивании клубней для пищевого применения, аналогично листьям культивируемого цикория, может служить источником получения БАВ.

Учитывая схожесть химического состава исследуемых видов растений, за основу была взята схема получения экстракта сухого травы цикория обыкновенного. По результатам проведенных балансовых загрузок оформлен и утвержден лабораторный регламент ЛР-04868244-05-2021 на получение экстракта сухого травы топинамбура.

Готовый продукт представляет собой аморфный порошок коричневого с желтоватым оттенком цвета, гигроскопичен, комкуется. Сыпучесть 6,83±0,04 г/с; угол естественного откоса 23±1° С; насыпная плотность при свободном падении 0,50±0,01 г/см^3, с уплотнением – 0,60±0,02 г/см^3. Содержание суммы фенольных соединений не менее 5 %.

Полученный экстракт травы топинамбура является потенциальной фармацевтической субстанцией иммуномодулирующего и гепатопротекторного действия и может служить основой создания лекарственных форм перорального применения.

Использование шрота цикория обыкновенного

Лекарственное растительное сырьё содержит большое разнообразие групп БАВ в своем составе. Процесс разработки технологии получения субстанций растительного происхождения направлен, прежде всего, на определение оптимальных параметров максимального извлечения целевых соединений, при этом в шроте остаются сопутствующие вещества, которые также могут быть использованы.

В связи с этим, нами исследована возможность применения шрота надземной и подземной части цикория обыкновенного в качестве кормовой добавки для жвачных животных. Для этого определено содержание общего белка, общего азота (по содержанию азота), аминного азота, содержание суммы аминокислот, исследован аминокислотный состав (Таблица 11).

В результате проведенного исследования было установлено, что шрот после получения экстрактов сухих может быть использован в пищевом рационе жвачных животных в качестве дополнительного источника белковых

веществ. Токсикологическое изучение шрота подтвердило его безопасность для применния в качестве кормовой добавки.

Таблица 11– Результаты исследования шрота цикория обыкновенного

Наименование показателя	ШРОТ		
	листьев цикория обыкновенного	травы цикория обыкновенного	корней цикория обыкновенного
Общий азот, %	3,39	2,14	0,94
Общий белок, %	21,19	13,38	5,88
Аминный азот, %	0,26	0,24	0,15
Сумма аминокислот в пересчете на глутаминовую кислоту, %	0,38	0,35	0,41
Содержание аминокислот (г/100 г продукта):			
Аспарагиновая кислота	1,18	1,45	0,41
Глутаминовая кислота	2,34	2,71	2,81
Серин	0,80	0,18	0,15
Гистидин	0,77	0,71	0,09
Глицин	1,04	0,45	0,76
Треонин	0,70	0,49	0,46
Аргинин	1,82	0,99	0,21
Аланин	1,66	0,34	0,80
Тирозин	1,64	0,77	0,27
Цистин	0,30	0,65	0,18
Валин	1,06	0,53	0,32
Метионин	0,66	0,24	0,11
Фенилаланин	0,82	0,47	0,27
Изолейцин	0,98	0,44	0,31
Лейцин	1,65	0,82	0,22
Лизин	2,15	0,84	0,99
Пролин	1,17	0,97	1,24
Всего	*20,74*	*13,05*	*9,61*

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время, расширение номенклатуры лекарственных средств, применяемых при различных заболеваниях, в том числе характеризующихся хроническим течением, за счет разработки новых препаратов растительного происхождения остается актуальным направлением фармацевтической науки в рамках импортозамещения.

Комплексная переработка растений позволяет разрабатывать рациональные экономически целесообразные технологии, обеспечивающие получение фармацевтических субстанций и создание на их основе современных лекарственных форм, а также функциональных пищевых продуктов. За счет применения ресурсосберегающих подходов достигается получение профилактических и лечебных средств, доступных широким слоям населения Российской Федерации.

Информационно-аналитические исследования позволили обосновать выбор перспективных видов растений семейства Астровых. В ходе фитохимических исследований и биологического скрининга была подтверждена целесообразность комплексного использования данных растений.

В результате проведенных исследований детально охарактеризован качественный состав травы цикория обыкновенного, установлены закономерности накопления и распределения БАВ в растении. На основании анализа опытных партий сырья предложены критерии его качества. Разработана и валидирована методика количественного определения фенольных соединений, являющаяся инструментом оценки их содержания в сырье, а также при постадийном контроле производства сухих экстрактов.

На основании полученных данных показана возможность использования листьев культивируемых сортов цикория обыкновенного в качестве дополнительного источника получения БАВ фенольного характера.

Наряду с этим, экспериментально подтверждена перспективность применения корней данного растения для получения фармацевтических субстанций и инулина, а также шрота – в качестве кормовой добавки.

При исследовании травы топинамбура установлена возможность её использования для получения лечебных средств целенаправленной фармакологической активности. Фитохимический анализ показал схожесть качественного состава листьев цикория обыкновенного и травы топинамбура, что позволило использовать единые подходы к разработке методик контроля качества и технологий их переработки.

Для унификации приёмов качественного и количественного анализа сырья предложено использование стандартных образцов веществ, являющихся их доминирующими компонентами. Разработана единая схема получения стандартных образцов, определены критерии их качества.

Таким образом, в результате комплексной переработки цикория обыкновенного получены фармацевтические субстанции гепатопротекторного и иммуномодулирующего действия, продукты пищевого назначения, а также кормовые добавки для животных. Показана возможность получения субстанции иммуномодулирующего действия из травы топинамбура. Разработана сопроводительная нормативно-техническая документация.

Обобщая полученные данные, можно сделать заключение, что предложенная концептуальная схема на основе комплексной переработки растений может служить алгоритмом действий, позволяющим проводить разработку новых эффективных лекарственных средств целенаправленного фармакологического действия с использованием отечественных растительных ресурсов.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1.Предложена концептуальная схема создания новых лекарственных средств и функциональных продуктов, заключающаяся в комплексном использовании растений и позволяющая разрабатывать ресурсосберегающие технологии получения фармацевтических субстанций и пищевых добавок со стабильными показателями качества.

2. В траве дикорастущего цикория методом ВЭЖХ-УФ-МС/МС идентифицированы соединения фенольного характера, представленные оксикумаринами (эскулетином и цикориином), гидроксикоричными кислотами (сложными эфирами кофейной, феруловой, кумаровой кислот с винной и хинной кислотами в различных сочетаниях) и флавоноидами (гликозидами кверцетина, кемпферола и лютеолина). Определены морфолого-анатомические признаки исследуемого сырья, установлены критерии его качества и нормы содержания фенольных соединений.

3. Установлена схожесть химического состава травы дикорастущих и листьев культивируемых растений, что подтверждает возможность использования сырья культивируемых сортов для расширения сырьевой базы дикорастущих видов.

4. Выявлены особенности распределения БАВ и их накопление в зависимости от места произрастания и сроков заготовки; определен оптимальный режим сушки сырья; разработана и валидирована методика количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на цикориевую кислоту в траве и листьях цикория обыкновенного.

5. Обоснована целесообразность применения в качестве лекарственного растительного сырья корней культивируемых сортов, имеющих схожий состав БАВ с сырьём дикорастущих растений. Установлены показатели качества данного сырья.

6. Охарактеризован фенольный комплекс травы топинамбура, представленный гидроксикоричными кислотами и флавоноидами; изучены закономерности их накопления в растении; определены критерии качества сырья, разработана и валидирована методика количественного определения суммы фенольных соединений в пересчете на хлорогеновую кислоту.

7. Предложен способ получения стандартных образцов цикориевой кислоты из листьев цикория обыкновенного и хлорогеновой кислоты - из листьев топинамбура, которые могут быть использованы в методиках контроля качества данного сырья, лекарственных средств и продуктов пищевого назначения.

8. Разработана рациональная технология получения фармацевтических субстанций; предложен способ переработки корней культивируемого цикория, позволяющий получить экстракт сухой и инулин в рамках единой технологической схемы; утверждены лабораторные регламенты на производство фармацевтических субстанций из травы цикория обыкновенного и травы топинамбура.

9. Оформлены проекты фармакопейных статей на новые виды лекарственного растительного сырья «Цикория обыкновенного трава», «Цикория обыкновенного листья», «Топинамбура трава», а также технические условия «Цикориевая кислота – стандартный образец», «Хлорогеновая кислота – стандартный образец».

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Сайбель О.Л. Перспективы использования цикория обыкновенного *Cichorium intybus* L. в качестве лекарственного растительного сырья (обзор) / О.Л. Сайбель, Т.Д. Даргаева // **Вопросы обеспечения качества лекарственных средств.** – 2015. – №2 (7) – С.36-42.

2. Изучение липофильных соединений травы и корней цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) / Сайбель О.Л., Даргаева Т.Д., Латыпова Г.М., Галкин Е.Г. // Бюллетень Восточно-сибирского научного центра СО РАМН. – 2015. – № 5 (105). – С.72-74.

3. Сайбель О.Л. Фармакогностическое изучение травы цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) / О.Л. Сайбель, Т.Д. Даргаева, О.Г. Потанина // **Вопросы обеспечения качества лекарственных средств. –** 2015. – №5 (10). – С. 30-36.

4. Сайбель О.Л. Характеристика фенольных соединений травы цикория обыкновенного / О.Л. Сайбель, Т.Д. Даргаева // Сборник трудов III научно-практической конференции «Молодые ученые и фармация XXI века». – М., 2016. – С.354-357.

5. Сайбель О.Л. Изучение фенольных соединений травы цикория обыкновенного / О.Л. Сайбель, Т.Д. Даргаева, К.А. Пупыкина // Башкирский химический журнал – 2016. – №1(23). – С.53-58.

6. Сайбель О.Л. Изучение желчегонной и гепатопротекторной активности травы цикория обыкновенного / О.Л. Сайбель, Т.Д. Даргаева, К.А. Пупыкина // **Медицинский вестник Башкортостана**. – 2015. – № 5. – С.70-73.

7. Разработка методики количественного анализа биологически активных веществ и оценка динамики их накопления в зависимости от фазы вегетации цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) / Сайбель О.Л., Даргаева Т.Д., Цицилин А.Н., Дул В.Н. // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2016. - № 6. – С.20-24.

8. Изучение динамики накопления фенольных соединений в траве цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) /Сайбель О.Л., Даргавева Т.Д., Фадеев Н.Б., Дул В.Н. // **Медицинский вестник Башкортостана**. – 2016. – Т. 11. - № 5 (65). – С.80-83.

9. Оценка антиоксидантной активности травы цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* l.) / Сайбель О.Л., Даргаева Т.Д., Пупыкина К.А., Петрова И.В., Фархутдинов Р.Р. // **Acta Biomedica Scientifica** – 2017. – т. 2. – №2 (114). – С.85-88. DOI: 10.12737/article_59a614fcd18c42.95236968

10. Изучение антиоксидантной активности травы цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты / Сайбель О.Л., Даргаева Т.Д., Лапин А.А., Зеленков В.Н. // Сборник научных трудов РАЕН. – М., 2016. – вып.24. – С.18-23.

11. Сайбель О.Л. Характеристика качественного состава флавоноидов травы цикория обыкновенного *Cichorium intybus L.* / О.Л.Сайбель, Т.Д.Даргаева, В.Н. Дул // Сеченовский вестник (электронное приложение). – 2016. – № 2(24). – С.72-73.

12. Сайбель О.Л. Оценка антиоксидантных свойств надземной части культивируемого цикория обыкновенного (C*ichorium intybus L) и* топинамбура *(Helianthus tuberosus L)*. / О.Л.Сайбель, Т.Д.Даргаева, В.Н.Зеленков // Материалы XII международного симпозиума «Новые и нетрадиционные растения и перспективы их использования». – Пущино, 2017. – С.70-72.

13. Сайбель О.Л. Топинамбур (*Helianthus tuberosus* L.) – перспективный источник сырья для получения профилактических и лечебных средств / О.Л. Сайбель, Т.Д. Даргаева, В.Н. Зеленков// Бутлеровские сообщения. – 2017. – Т.51. – №8. – С.58-64.

14. Сайбель О.Л. Оценка содержания флавоноидов в траве дикорастущего цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) / О.Л. Сайбель, Т.Д. Даргаева, В.Ю. Масляков //**Вопросы обеспечения качества лекарственных средств**. – 2018. – № 1 (19). – С.32-37.

15. Сайбель О.Л. Накопление цикориевой кислоты в надземной части дикорастущего цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) / О.Л.Сайбель, Т.Д.Даргаева, С.Л.Баслинов // Сборник научных трудов международной конференции «Перспективы лекарственного растениеведения», посвященной 100-летию со дня рождения проф. А.И. Шретера. – М., 2018. – С.533-539.

16. Кузина О.С. Оценка острой токсичности цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) травы экстракта сухого / О.С.Кузина, А.Н.Бабенко, О.Л. Сайбель // Сборник материалов XXVI Российского национального конгресса «Человек и лекарство». Тезисы докладов. – М., 2019. – С.74.

17. Biological active substances of the chicory aerial part (*Cichorium intybus* L.) / Saybel O.L., Radimich A.I., Dargaeva T.D., Adamov G.V.// Traditional medicine: ways of consolidation with modern care. Proceeding of the IX international research practice conference. – Ulan-Ude, 2019. – P.47-49.

18. Патент 2710270 Российской Федерации. Средство, обладающее иммуномодулирующей активностью и способ его получения / Сайбель О.Л., Даргаева Т.Д., Радимич А.И., Дул В.Н., Николаев С.М., Хобракова В.Б., Мизина П.Г., Сидельников Н.И. – №2019125854, заявл. 16.08.2019, опубл. 25.12.2019.

19. Phenolic compounds and immunomodulating activity of chicory (*Cichorium intybus* L.) extract / Saybel O.L., Rendyuk T.D. Dargaeva T.D., Nikolaev S.M., Khobrakova V.B.// **Pharmacognosy Journal**. – 2020. – V.12(5). – P. 1104-1107. DOI:10.5530/pj.2020.12.156.

20. Сравнительное фитохимическое изучение надземной части дикорастущего и культивируемого растения цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) / Сайбель О.Л., Радимич А.И., Адамов Г.В., Даргаева Т.Д. //**Химия растительного сырья**. – 2020. – №3. – С.185-195. DOI: 10.14258/jcprm.2020037386

21. Перспективы применения цикория культивируемого в медицинской практике / Степанов Ц.Б., Николаев С.М., Хобракова В.Б., Сайбель О.Л. // Сборник материалов IX Международной научно-практической конференции посвященной 75-летию Победы в Великой Отечественной войне. Формы и методы социальной работы в различных сферах жизнедеятельности. – Улан-Удэ, 2020. – С. 274-275.

22. Токсичность цикория обыкновенного (C*ichorium intybus* L.) травы экстракта сухого при однократном введении / Кузина О.С., Боровкова М.В., Лемясева С.В., Сайбель О.Л. // Сборник материалов международной научной конференции «От растения до лекарственного препарата». – М., 2020. – С. 387-391.

23. Оценка токсичности дикорастущего цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* l.) травы экстракта сухого при однократном введении лабораторным животным / Кузина О.С., Боровкова М.В., Бабенко А.Н.,

Сайбель О.Л. // Научно-практический журнал Известия ГГТУ (Медицина. Фармация). – Орехово-Зуево, 2020. – №4. – С.158-160.

24. Морфолого-анатомические признаки некоторых новых видов лекарственного растительного сырья. Атлас. / Коняева Е.А., Алентьева О.Г., Сайбель О.Л., Даргаева Т.Д., Потанина О.Г., Мизина П.Г., Сидельников Н.И.– М.: ФГБНУ ВИЛАР, 2020. – 211 с.

25. Основные фенольные соединения цикория обыкновенного и их распределение в растении / Сайбель О.Л., Радимич А.И., Даргаева Т.Д., Адамов Г.В. // PLANTA+. Наука. Практика. Образование». Материалы международной научно-практической конференции. – Киев, 2021. – С. 51-55.

26. Сайбель О.Л. Сравнительное морфолого-анатомическое изучение цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) и возможных примесных видов / О.Л. Сайбель, Е.А. Коняева, Т.Д. Даргаева // Сборник материалов юбилейной Международной научной конференции «90 лет – от растения до лекарственного препарата: достижения и перспективы». – М., 2021. – С. 367-372. DOI: 10.52101/9785870191003_2021_367.

27. Экспериментальное исследование противовоспалительных свойств экстракта травы дикорастущего цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) / Лупанова И.А., Ферубко Е.В., Сайбель О.Л., Курманова Е.Н., Николаев С.М. // Сборник трудов международной научной конференции «От растения до лекарственного препарата». – М., 2021. – С.348-352

28. Токсичность цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) культивируемого травы экстракта сухого на лабораторных животных разного возраста / Кузина О.С., Боровкова М.В., Бабенко А.Н., Сайбель О.Л. // Сборник трудов международной научной конференции «От растения до лекарственного препарата». – М., 2021. – С.570-575

29. Маврина П.О. Возможности использования листьев культивируемого цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) в качестве лекарственного растительного сырья (обзор) / П.О. Маврина, О.Л. Сайбель, Е.Л. Маланкина // Овощи России. – 2021. – №4. – С.105-110.

30. Сайбель О.Л. Обоснование выбора методики стандартизации травы цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) / О.Л. Сайбель // **Вопросы обеспечения качества лекарственных средств**. – 2021. – №2(32). – С.4-11. DOI: 10.34907/JPQAI.2021.52.51.002

31. Оценка антиоксидантной активности экстракта из травы дикорастущего цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) в условиях *in vitro* / Лупанова И.А., Ферубко Е.В., Курманова Е.Н., Сайбель О.Л., Николаев С.М.// Сборник материалов III международного симпозиума «Innovations in life sciences». – Белгород, 2021. – С. 75.

32. Кузина О.С. Сравнительное изучение диуретического и гипоазотемического действия цикория обыкновенного (*Cichorium intybus* L.) травы экстрактов сухих / О.С. Кузина, А.Н. Бабенко, О.Л. Сайбель // Сборник

материалов 5-ой Российской конференции по медицинской химии с международным участием «МедХим – Россия 2021». – Волгоград, 2021. – С. 450.

33. Химический состав фракций надземной части культивируемого цикория обыкновенного и их антиоксидантная активность / Сайбель О.Л., Радимич А.И., Даргаева Т.Д., Адамов Г.В., Зеленков В.Н., Лапин А.А. // **Химия растительного сырья**. – 2021. – №4. – С.165-173. DOI: 10.14258/jcprm.2021049316.

34. A perspective botanical drug: hepatoprotective activity of dry extract prepared from the aerial part of Chicory plant (*Cichorium intybus* L.) / Bortnikova V.V., Krepkova L.V., Babenko A.N., Saybel' O.L., Borovkova M.V., Kuzina O.S., Mizina P.G., Job K.M., Sherwin C.M., Enioutina E.Y. // Clinical pharmacology in drug development. Special Issue: 2021 Annual Meeting American College of Clinical Pharmacology®. – Salt Lake City, 2021. – V.10(S1). – P. 100-101. DOI: 10. 1002/cpdd.1004

35. Сравнительная характеристика желчегонного действия экстракта и травы и корня цикория обыкновенного у интактных крыс / Степанов Ц.Б., Сайбель О.Л., Самбуева З.Г., Антрдёнова Д.А. // Материалы Всероссийской научно-практической конференции «Растительные адаптогены в восстановительной медицине». – Улан-Удэ, 2021. – С.53-54.

36. Сайбель О.Л. Количественная оценка фенольных соединений в экстракте травы цикория обыкновенного / О.Л.Сайбель, А.И.Радимич, Т.Д. Даргаева // Сборник материалов Международная научно-практической конференции «Разработка лекарственных средств – традиции и перспективы». – Томск, 2021. – С.153-154.

37. Гепатопротекторная активность экстракта травы цикория обыкновенного и его химический состав / Сайбель О.Л., Радимич А. И., Даргаева Т.Д., Лупанова И.А., Ферубко Е.В., Курманова Е.Н., Мартынчик И.А.// **Разработка и регистрация лекарственных средств**. – 2021. – № 10(4). – С.36-45. DOI: 10.33380/2305-2066-2021-10-4-36-45

38. Сайбель О.Л. Принцип комплексного использования растительного сырья как инструмент ресурсосберегающих технологий получения лечебных и профилактических средств / О.Л.Сайбель // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2021. – № 24(12). – С. 3−10. DOI: 10.29296/25877313-2021-12-01

39. Hepatoprotective Plants - How Can We Optimize Waste Free Uses of Such Highly Versatile Resources? / Krepkova L. V., Babenko A.N., Saybel O.L., Lupanova I.A., Kuzina O.S., Job K. M., Sherwin C.M., Enioutina E.Y. // Valuable Frontiers in Pharmacology. – 2021. – V.12. – P.3213. DOI:10.3389/fphar.2021.738504

40. Прогнозирование механизмов фармакологического действия многокомпонентного растительного экстракта с помощью веб-ресурса PASS

online на примере травы цикория обыкновенного / Адамов Г.В., Сайбель О.Л., Мизина П.Г.//**Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии**. – 2021. – № 24(12). – С. 36-40. DOI:10.29296/25877313-2021-12-05.

41. Сайбель О.Л. Исследование фенольных соединений травы топинамбура (*Helianthus tuberosum* L.). / О.Л. Сайбель // **Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии.** – 2022. – № 25(2). – С.7-13 DOI: 10.29296/25877313-2022-02-02.

42. Подходы к стандартизации травы топинамбура / Сайбель О.Л., Коняева Е.А., Радимич А.И., Даргаева Т.Д. // **Вопросы обеспечения качества лекарственных средств.** – 2022. – № 1(35). – С. 4-6.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАВ	Биологически активные вещества
ВЭЖХ-УФ	Высокоэффективная жидкостная хроматография с УФ-детектированием
ВЭЖХ-УФ-МС/МС	Высокоэффективная жидкостная хромато-масс-спектрометрия
ГФ РФ	Государственная фармакопея Российской Федерации
СО	Стандартный образец
СФМ	Спектрофотометрия
ТСХ	Хроматография в тонком слое сорбента
ФС	Фармакопейная статья
ЯМР	Ядерный магнитный резонанс
ЭА	Этилацетатная фракция
БУ	Бутанольная фракция
СП	Спиртовая фракция
ВО	Водная фракция
м.д.	Миллионные доли
хс	Химический сдвиг
д.	Дуплет
с.	Синглет