

На правах рукописи



ПЕТУХОВА СВЕТЛАНА АНДРЕЕВНА

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
ВОЛОДУШКИ КОЗЕЛЕЦЕЛИСТНОЙ
(*BUPLEURUM SCORZONERIFOLIUM* WILLD.) ТРАВЫ
И РАЗРАБОТКА НА ЕЕ ОСНОВЕ ЭКСТРАКТА СУХОГО**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Улан-Удэ – 2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

Мирович Вера Михайловна – доктор фармацевтических наук.

Официальные оппоненты:

Анциупова 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.

Шишмарева Татьяна Михайловна – кандидат фармацевтических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей и экспериментальной биологии Сибирского отделения Российской академии наук» / лаборатория медико-биологических исследований, научный сотрудник.

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Омский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Омск.

Защита состоится «12» декабря 2018 г. в 10.00 часов на заседании диссертационного совета Д 999.140.03 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 «11» октября 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д.б.н., доцент



Хобракова Валентина Бимбаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. В лекарственных растениях содержатся комплексы биологически активных веществ, которые обладают широким спектром терапевтического действия, и как правило, мало токсичны, характеризуются плавно нарастающим, стабильным фармакологическим эффектом.

Применение растительных средств имеет существенное значение в системе профилактики и терапии заболеваний органов пищеварения (Виноградова Т.А., 1998).

Некоторые виды рода *Bupleurum* L. используют как лекарственные растения, они изучены как источники биологически активных веществ (Канунникова Ю.С., 2011; Минаева В.Г., 1970). В научной медицине используется трава володушки многожилчатой – *Bupleurum multinerve* DC (ВФС – 42-580-76). На ее основе предложен препарат буплерин, обладающий противовоспалительной, желчегонной и Р-витаминной активностью. В китайской и японской медицине виды растений рода *Bupleurum* используют для лечения заболеваний печени, дискинезии желчевыводящих путей, нефротического синдрома и аутоиммунных заболеваний. В фармакопее Китая, Японии и Индии включены володушка китайская – *B. chinensis* DC, володушка серповидная – *B. falcatum* L. (Guo J. X., 1990; Pan S. L., 2006; Ashour M. L., 2011).

В народной медицине России володушка козелецелистная – *B. scorzonerifolium* Willd. используется как желчегонное и противовоспалительное средство. Наружно настой травы применяют при заболеваниях глаз, зудящих и гнойничковых заболеваниях кожи (Лавренов В.К., 1999; Телятьев В.В., 1987).

По данным литературы, растения рода *Bupleurum* накапливают фенольные соединения (флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, кумарины), тритерпеноиды, фитостерины, дубильные вещества (Pistelli L., 1993; Olennikov D.N., 2013; Канунникова Ю.С., 2014; Тыхеев Ж.А., 2014). Биологически активные вещества *B. scorzonerifolium* изучены не в полной мере. В Прибайкалье *B. scorzonerifolium* образует заросли на степных лугах, открытых каменистых склонах и имеет достаточные сырьевые ресурсы для промышленного использования (Федосеева Г.М., 1997). Исследования надземных органов *B. scorzonerifolium* как возможного источника растительных средств для применения в медицинской практике является актуальным.

Степень разработанности темы исследования.

Первые сведения о химическом составе растений рода *Bupleurum* были получены в 1960-е годы отечественными учеными. Минаевой В. Г. с соавторами изучался состав флавоноидов сибирских видов рода *Bupleurum* (1970, 1978, 1985, 1991). Желчегонная активность водных извлечений установлена для *B. aureum* и *B. scorzonerifolium* Вограликом В.Е. с соавторами (1946). Фармакогностические исследования *B. aureum* проводились Канунниковой Ю.С. (2014). Оленниковым Д.Н. с соавторами методом ВЭЖХ проводилось исследование состава фенольных соединений растений рода *Bupleurum* республики Бурятия (2013). Изучению компонентного состава эфирного масла *B. scorzonerifolium*

посвящены работы Зыковой И.Д. (2014), Раднаевой Л.Д. (2014, 2017). Исследования зарубежных авторов посвящены, большей частью, изучению сайкосапонинов видов рода *Bupleurum* (Abe H., 1980; Pan S.L., 2006; Ashour M.L., 2011).

Цель и задачи исследования. Фитохимическое изучение надземных органов *B. scorzonerifolium*, произрастающей в Прибайкалье, стандартизация сырья и разработка экстракта сухого.

Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать состав биологически активных веществ (БАВ) надземных органов *B. scorzonerifolium*, выделить и идентифицировать флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, кумарины; изучить состав аминокислот, сапонинов, эфирного масла, высокомолекулярных жирных кислот, макро- и микроэлементов.

2. Дать оценку количественному содержанию основных групп БАВ в надземных органах *B. scorzonerifolium*, провести изучение закономерностей накопления БАВ в зависимости от фазы вегетации, в различных органах растения, определить срок сбора сырья.

3. Изучить внешние и микроскопические диагностические признаки травы *B. scorzonerifolium*, определить запасы сырья в Прибайкалье.

4. Провести исследования по стандартизации сырья *B. scorzonerifolium* и разработке проекта нормативной документации (ФС).

5. Разработать технологию получения экстракта сухого из травы *B. scorzonerifolium*, провести его стандартизацию и разработать проект нормативной документации (ФСП).

Научная новизна. Впервые проведено комплексное фармакогностическое исследование надземных органов *B. scorzonerifolium*, произрастающей в Прибайкалье. В результате химического исследования установлено содержание 24 флавоноидов (производных кверцетина, кемпферола, изорамнетина), из которых 13 соединений для *B. scorzonerifolium* описаны впервые. Установлено содержание 7 кислот (кофейной, цикориевой, коричной, 1-*O*-кофеилхинной, 3-*O*-ферулоилхинной, 5-*O*-ферулоилхинной, 4,5-ди-*O*-кофеилхинной), эпикатехина, катехина, эпигаллокатехингаллата, кумарина.

Методом УВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС проведено исследование в надземных органах метаболомного профиля тритерпеновых соединений, в результате установлено содержание 14 тритерпеновых гликозидов (сайкосапонинов А, В₂, С, D, ВК₁, М, N, F и их изомеров; буплевозида VI).

Определен состав эфирного масла: преобладающими компонентами являются β-гвайен, кариофиллен, аромадендрена оксид, кариофиллена оксид. Впервые установлено содержание для вида *B. scorzonerifolium* β-гвайена, аромадендрена, ледена оксида. Идентифицировано 17 высокомолекулярных жирных кислот, их состав характеризуется высоким содержанием непредельных кислот – линолевой (31,8%), α-линоленовой (13,7%). Минеральный комплекс растения содержит 9 макро-, 63 микро- и ультрамикроэлементов. Дана оценка количественного содержания в надземных органах *B. scorzonerifolium* органических кислот, дубильных веществ, фенолкарбоновых кислот,

флавоноидов, кумаринов, сапонинов. Изучена динамика накопления полифенольных соединений по органам и фазам вегетации *B. scorzonerifolium*.

Практическая значимость.

Предложены и валидированы методики количественного определения суммы флавоноидов и суммы фенолкарбоновых кислот в траве *B. scorzonerifolium* и экстракте сухом. Разработаны проекты ФС «Володушки козелецелистной трава – *Vupleuri scorzonerifolii herba*», ФСП «Володушки козелецелистной экстракт сухой – *Vupleuri scorzonerifolii extractum siccum*», инструкция по сбору и сушке сырья *B. scorzonerifolium*. Предложена технология получения экстракта сухого (патент на изобретение № 2665968, зарегистрированный в государственном реестре изобретений РФ 05.09.2018 г).

Степень внедрения. В учебный процесс в Иркутском государственном медицинском университете по специальности «Фармация» внедрены результаты диссертационной работы на дисциплинах фармакогнозия, основы фитотерапии, фармацевтическая химия, а также на циклах повышения квалификации провизоров. Результаты исследований используются в работе лаборатории контроля качества предприятия «Иван-чай» (Иркутская область).

Методология и методы исследования. При планировании диссертационного исследования были проанализированы сведения литературы, патенты, изобретения, дана оценка актуальности и степени изученности темы, а также сформулированы задачи и цель исследования. В экспериментальных исследованиях применялись современные физико-химические методы: высокоэффективная жидкостная, ультравысокоэффективная жидкостная хроматография, газовая хромато-масс-спектрометрия, спектрофотометрия, тонкослойная хроматография, а также методы: бумажная хроматография, титриметрия.

На защиту выносятся:

- фитохимическое изучение *B. scorzonerifolium*, произрастающей в Прибайкалье, исследования закономерностей накопления БАВ в надземных органах *B. scorzonerifolium*;
- макро-, микроскопическое исследование *B. scorzonerifolium*;
- стандартизация и разработка проекта ФС на сырье *B. scorzonerifolium*;
- способ получения экстракта сухого из травы *B. scorzonerifolium*, исследование химического его состава и стандартизация.

Личное участие автора. Автором подобраны и проанализированы источники литературы по теме диссертации, сформулированы цель и задачи исследования. Самостоятельно проведены экспериментальные исследования и статистическая обработка результатов, написаны статьи, тезисы, доклады для участия в конференциях, автореферат и диссертация.

Апробация полученных результатов. Полученные результаты и основные положения диссертационной работы докладывались и обсуждались на конференциях различного уровня. Международные конференции: «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» (Пятигорск, 2016), «Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и

производства» (Белгород, 2016), «Перспективы развития биологии, медицины и фармации» (Республика Казахстан, Шимкент, 2016). Всероссийские конференции: «Актуальные вопросы современной медицины» (Иркутск, 2016, 2017, 2018), «Инновационные технологии в фармации» (Иркутск, 2016, 2017, 2018), «Инновации в здоровье нации» (Санкт-Петербург, 2016).

Связь задач исследования с проблемным планом фармацевтических наук. Диссертационное исследование проводилось в рамках плана научно-исследовательской работы Иркутского государственного медицинского университета по теме «Изучение перспективных лекарственных растений Восточной Сибири», номер государственной регистрации 01.2.00304320.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Диссертационное исследование соответствует формуле специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, пунктам 3, 6.

Публикации. Результаты диссертации представлены в 18 научных работах, из них 1 Патент РФ на изобретение, 6 статей в периодических изданиях, рекомендованных ВАК МОиН РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа объемом 224 страницы машинописного текста содержит введение, 6 глав (обзор литературы, описание объектов и методов, 4 главы посвящены результатам собственных исследований), выводы и приложения. Работа иллюстрирована 50 таблицами и 49 рисунками. В списке литературы приводится 170 источников, на иностранных языках – 67.

Во введении обоснована актуальность темы, сформулированы цель и задачи исследований, обозначена новизна и практическая значимость проведенных исследований, а также положения, выносимые на защиту.

Первая глава содержит аналитический обзор отечественной и зарубежной литературы: распространение растений рода *Vupleurum* и вида *B. scorzonerifolium*, ботаническое описание, сведения по химическому составу, использованию растений рода *Vupleurum* в медицине и изучению фармакологического действия.

Вторая глава посвящена описанию объектов и методов исследований.

В третьей главе отражены результаты фитохимического исследования *B. scorzonerifolium*. Приведены данные по изучению динамики накопления основных БАВ по органам растения и фазам вегетации.

В четвертой главе приведены данные по микроскопическому изучению и материалы по ресурсному исследованию *B. scorzonerifolium*.

В пятой главе изложены материалы по товароведческому анализу *B. scorzonerifolium*, разработке методик количественного определения суммы флавоноидов и суммы фенолкарбоновых кислот, установлению норм качества и срока годности сырья.

В шестой главе изложена технология получения экстракта сухого *B. scorzonerifolium* и данные по изучению его химического состава и стандартизации.

В приложении представлены проект ФС «Володушки козелецелистной трава – *Viplexuri scorzonerifolii herba*»; проект ФСП «Володушки козелецелистной экстракт сухой – *Viplexuri scorzonerifolii extractum siccum*»; «Инструкция по сбору и сушке сырья володушки козелецелистной»; заключение о результатах фармакологического исследования экстракта сухого володушки козелецелистной; результаты изучения стабильности травы *B. scorzonerifolium* (цельное сырье) в процессе хранения; основные документы, отражающие внедрение результатов диссертационной работы.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследований

Объектом исследования явились образцы сырья *B. scorzonerifolium* сем. *Ariaceae* L., собранные в 2014-2017 гг. в Иркутской области. Для изучения динамики накопления БАВ образцы сырья собирали в разные фазы вегетации.

Описание внешних признаков сырья и микроскопические исследования проводили по методикам ГФ XIII: ОФС.1.5.1.0002.15 «Травы», ОФС.1.5.3.0003.15 «Техника микроскопического и микрохимического исследования лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов». Микроскопические исследования проводили на микроскопах МБС-9, Микмед-1. Микрофотографии препаратов выполняли на микроскопе «Levenhug» (США) с цифровой фотокамерой с последующей обработкой фотографий в программе Windows Adobe Photoshop 8.1.

Обнаружение и идентификацию биологически активных веществ проводили с помощью качественных реакций и хроматографических методов исследований: БХ – на бумаге Санкт-Петербургской фабрики № 2 марки «М» и Filtrak FN-12, 16; ТСХ – на пластинках Sorbfil ПТСХ П-А-УФ-254.

Спектральные исследования проводили на спектрофотометре СФ-2000 (Россия), СФ-46 (Россия), LEKI SS 1207UV (Финляндия) с использованием кварцевых кювет с толщиной поглощающего слоя 1 см.

Исследование компонентного состава фенольных соединений проводили методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе GILSON (Франция) (колонка Kromasil C18 4,6×250мм; 5 мкм); режим элюирования – изократический; элюент – ацетонитрил-вода-кислота фосфорная концентрированная (20:80:0,05).

Идентификацию фенольных соединений и тритерпеновых гликозидов проводили методом УВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС на жидкостном хроматографе LCMS-8050 (Shimadzu, Columbia, MD, USA), соединенном с диодно-матричным детектором (ДМД) и 3Q детектором с ионизацией электрораспылением (ИЭР/МС; electrospray ionization, ESI), используя колонку GLC Mastro C18 (150×2,1 мм, Ø 3 мкм; Shimadzu, Kyoto, Japan).

Компонентный состав эфирного масла исследовали на приборе Agilent Technologies (6890N) с квадрупольным масс-спектрометром MSD 5973 в качестве детектора, на кварцевой колонке HP-5MS (30 м × 0,2-5 мм). Идентификацию соединений проводили путем сравнения полных масс-спектров и времен

удерживания с соответствующими данными стандартных соединений и по данным масс-спектральной библиотеки «Nist 8» и «Nist 11».

Исследование компонентного состава высокомолекулярных жирных кислот проводили на приборе Agilent Technologies (6890N) с квадрупольным масс-спектрометром MSD 5973 в качестве детектора на капиллярной колонке HP-INNOWAX (30м × 250 мкм × 0,25 мкм; неподвижная фаза – полиэтиленгликоль; подвижная фаза – гелий; скорость потока газа – 1 мл/мин). Идентификацию соединений проводили с помощью расчета эквивалентной длины алифатической цепи (ECL), по данным библиотеки масс-спектров «Nist 5», Christie, а также путем сравнения времени удерживания со временами удерживания стандартных соединений.

Элементный состав образцов устанавливали на квадрупольном масс-спектрометре Agilent 7500 се с использованием инертной системы ввода образца.

Количественный анализ фенольных соединений осуществляли на микроколоночном жидкостном хроматографе Милихром А-02 (Эконова, Новосибирск, Россия), снабженного колонкой ProntoSIL-120-5-C18 AQ (2 × 75 мм, Ø 5 мкм; Metrohm AG, Herisau, Switzerland); подвижная фаза: 0,2 М LiClO₄ в 0,006 М HClO₄ (А), MeCN (В).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью программ статистической обработки данных Statistica MS Excel. Для выявления статистической значимости различий использовали параметрический критерий Стьюдента (t).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование химического состава *Vupleurum scorzonerifolium*, произрастающей в Прибайкалье

Аналитическими реакциями, БХ и ТСХ подтверждено содержание в *V. scorzonerifolium* флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, кумаринов, аскорбиновой кислоты, аминокислот, эфирного масла, жирного масла, полисахаридов, дубильных веществ.

Выделение флавоноидов, фенолкарбоновых кислот проводили колоночной хроматографией на полиамидном сорбенте фирмы «Woelm». По данным хроматографического, спектрального анализа идентифицированы флавоноиды – изорамнетин (5,7,4' – триокси-3'-метоксифлавонол), кемпферол (5,7,4'-триоксифлавонол), кверцетин (5,7,3',4'- тетрагидроксифлавонол), гиперозид (кверцетин-3-О-β-D-галактозид), рутин (кверцетин-3-О-β-D-рамноглюкозид), нарциссин (изорамнетин-3-О-β-D-рамноглюкозид); фенолкарбоновые кислоты – кофейная, 3-О-кофеилхинная. На колонке с силикагелем выделены кумарины – кумарин (бензо-α-пирон), эскулетин (6,7-дигидроксикумарин).

Присутствие выделенных фенольных соединений подтверждается данными ВЭЖХ, а также в ходе анализа установлено содержание кислот – галловой, цикориевой, феруловой, коричной; флавоноидов – вицинина, лютеолин-7-О-β-D-глюкозида, изокверцитрина, изорамнетин-3-О-β-D-глюкозида, апигенина,

катехина, эпикатехина, эпигаллокатехингаллата. Впервые для *B. scorzonerifolium* идентифицированы виценин и лютеолин-7-*O*- β -D-глюкозид.

Более полные сведения о составе флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в наземных органах *B. scorzonerifolium* получены с использованием метода УВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС. Идентифицированы 7 фенолкарбоновых кислот и 17 флавоноидов (табл. 1). Из них впервые для *B. scorzonerifolium* идентифицированы соединения 8-15, 18, 19, 24.

Таблица 1 – Хроматографические и спектральные параметры фенольных соединений, идентифицированных в траве *B. scorzonerifolium*

№	Соединение	t_R , мин	λ_{max} , нм	(-)ESI-МС ^B , m/z
1	2	3	4	5
1	1- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота ^{а,*}	1,28	327	353 [M-H] ⁻ , 191, 179, 135
2	4- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота ^а	3,15	327	353 [M-H] ⁻ , 191, 179, 135
3	5- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота ^а	5,41	327	353 [M-H] ⁻ , 191, 179, 135
4	3- <i>O</i> -Ферулоилхинная кислота ^{а,*}	5,76	318	367 [M-H] ⁻ , 193, 191, 149
5	5- <i>O</i> -Ферулоилхинная кислота ^{а,*}	6,71	318	367 [M-H] ⁻ , 193, 191, 149
6	3,5-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота ^а	7,88	327	515 [M-H] ⁻ , 353, 191, 179, 135
7	4,5-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота ^{а,*}	9,61	328	515 [M-H] ⁻ , 353, 191, 179, 135
8	Изорамнетин-3- <i>O</i> -(2'',6''-ди- <i>O</i> -рамнозил)глюкозид-7- <i>O</i> -рамнозид ^{б,*}	10,84	254, 355	915 [M-H] ⁻ , 769 [M-H-Rha] ⁻ , 623 [M-H-2×Rha] ⁻ , 477 [M-H-3×Rha] ⁻ , 471, 315 [M-H-3×Rha-Glc] ⁻
9	Изорамнетин-3- <i>O</i> -(2'',6''-ди- <i>O</i> -рамнозил) галактозид-7- <i>O</i> -рамнозид ^{б,*}	11,23	254, 355	915 [M-H] ⁻ , 769 [M-H-Rha] ⁻ , 623 [M-H-2×Rha] ⁻ , 477 [M-H-3×Rha] ⁻ , 471, 315 [M-H-3×Rha-Gal] ⁻
10	Кверцетин-3- <i>O</i> -(2'',6''-ди- <i>O</i> -рамнозил)глюкозид (мангаслин) ^{а,*}	12,95	255, 356	755 [M-H] ⁻ , 609 [M-H-Rha] ⁻ , 471, 463 [M-H-2×Rha] ⁻ , 325, 301 [M-H-2×Rha-Glc] ⁻
11	Кверцетин-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -глюкозил)глюкозид ^{а,*}	12,99	255, 354	625 [M-H] ⁻ , 463 [M-H-Glc] ⁻ , 341, 301 [M-H-2×Glc] ⁻
12	Кемпферол-3- <i>O</i> -(2'',6''-ди- <i>O</i> -рамнозил)глюкозид ^{б,*}	13,09	265, 348	739 [M-H] ⁻ , 593 [M-H-Rha] ⁻ , 472, 447 [M-H-2×Rha] ⁻ , 325, 285 [M-H-2×Rha-Glc] ⁻
13	Кемпферол-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -рамнозил)глюкозид-7- <i>O</i> -рамнозид ^{б,*}	14,49	266, 345	739 [M-H] ⁻ , 593 [M-H-Rha] ⁻ , 447 [M-H-2×Rha] ⁻ , 325, 285 [M-H-2×Rha-Glc] ⁻
14	Изорамнетин-3- <i>O</i> -(2'',6''-ди- <i>O</i> -рамнозил)глюкозид (тифанеозид) ^{а,*}	14,56	254, 354	769 [M-H] ⁻ , 623 [M-H-Rha] ⁻ , 472, 477 [M-H-2×Rha] ⁻ , 325, 315 [M-H-2×Rha-Glc] ⁻
15	Изорамнетин-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -рамнозил)глюкозид-7- <i>O</i> -рамнозид ^{а,*}	14,78	254, 355	769 [M-H] ⁻ , 623 [M-H-Rha] ⁻ , 472 [M-H-2×Rha] ⁻ , 325, 315 [M-H-2×Rha-Glc] ⁻

1	2	3	4	5
16	Кверцетин-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -рамнозил)глюкозид (рутин) ^a	14,94	255, 355	609 [M-H] ⁻ , 463 [M-H-Rha] ⁻ , 325, 301 [M-H-Rha-Glc] ⁻
17	Кверцетин-3- <i>O</i> -глюкозид (изокверцитрин) ^a	15,22	256, 356	463 [M-H] ⁻ , 301 [M-H-Glc] ⁻
18	Кемпферол-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -рамнозил)глюкозид (никотифлорин) ^{a,*}	15,51	265, 346	593 [M-H] ⁻ , 447 [M-H-Rha] ⁻ , 325, 285 [M-H-Rha-Glc] ⁻
19	Кемпферол-3- <i>O</i> -глюкозид-7- <i>O</i> -рамнозид ^{a,*}	15,73	266, 345	593 [M-H] ⁻ , 447 [M-H-Rha] ⁻ , 431 [M-H-Rha] ⁻ , 285 [M-H-Rha-Glc] ⁻
20	Изорамнетин-3- <i>O</i> -(6''- <i>O</i> -рамнозил)глюкозид (нарциссин) ^a	15,95	254, 354	623 [M-H] ⁻ , 477 [M-H-Rha] ⁻ , 325, 315 [M-H-Rha-Glc] ⁻
21	Кверцетин-3- <i>O</i> -рамнозид (кверцитрин) ^a	15,99	265, 355	447 [M-H] ⁻ , 301 [M-H-Rha] ⁻
22	Кемпферол-3- <i>O</i> -глюкозид (астрагалин) ^a	16,26	265, 348	447 [M-H] ⁻ , 285 [M-H-Glc] ⁻
23	Изорамнетин-3- <i>O</i> -глюкозид ^a	16,49	255, 356	477 [M-H] ⁻ , 315 [M-H-Glc] ⁻
24	Кемпферол-3- <i>O</i> -рамнозид ^{a,*}	17,21	265, 349	431 [M-H] ⁻ , 285 [M-H-Rha] ⁻

^a Используются данные веществ сравнения; ^b использованы данные литературы; ^B Gal – галактоза, Glc – глюкоза, Rha – рамноза. * - соединения, обнаруженные в *B. scorzonerifolium* впервые.

В ходе изучения метаболомного профиля тритерпеновых соединений методом УВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС идентифицировано 14 гликозидов, производных олеанана (сайкосапонины А, В₂, С, D, ВК₁, М, N, F и их изомеры; буплеврозид VI) (табл. 2).

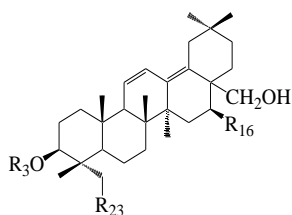
В составе эфирного масла *B. scorzonerifolium* идентифицировано 33 компонента, из которых преобладающими являются β-гвайен, кариофиллен, ледена оксид (II), кариофиллен оксид, β-цис-оцимен, лимонен, аромадендрена оксид (II), терпинолен, муrolан-3,9(11)-диен-10-перокси, γ-гимахален. Впервые для *B. scorzonerifolium* установлено содержание β-гвайена, аромадендрена, ледена оксида.

В надземных органах *B. scorzonerifolium* обнаружено 17 высокомолекулярных жирных кислот. Отмечается высокое содержание непредельных кислот линолевой (31,8 %) и α-линоленовой (13,7 %). Идентифицировано 7 свободных аминокислот, среди которых незаменимые – лизин, треонин, валин.

В составе минерального комплекса *B. scorzonerifolium* содержится 9 макро-, 63 микро- и ультрамикроэлемента. Содержание токсичных элементов в образцах сырья соответствует требованиям ГФ XIII.

Таблица 2 – Хроматографические и спектральные параметры тритерпеновых гликозидов, идентифицированных в надземных органах *B. scorzonerifolium* (λ_{\max} 205нм)

№	Соединение	t_R , мин	(-)ESI-MC ^B , m/z
1	Сайкосапонин М ^б	14,71	805 [M-H] ⁻ , 643 [M-Glc] ⁻ , 497 [M-Glc-Fuc] ⁻
2	Изомер сайкосапонина F ^б	15,25	927 [M-H] ⁻ , 765 [M-Hex] ⁻ , 619 [M-Hex-dHex] ⁻ , 457 [M-2×Hex-dHex] ⁻
3	Сайкосапонин ВК ₁ ^б	16,23	925 [M-H] ⁻ , 779 [M-Rha] ⁻ , 763 [M-Glc] ⁻ , 617 [M-Glc-Rha] ⁻ , 455 [M-2×Glc-Rha] ⁻
4	Сайкосапонин N ^б	18,47	941 [M-H] ⁻ , 749 [M-Rha] ⁻ , 779 [M-Glc] ⁻ , 633 [M-Glc-Rha] ⁻ , 471 [M-2×Glc-Rha] ⁻
5	Буплеврозид VI ^б	19,53	795 [M-H] ⁻ , 633 [M-Glc] ⁻ , 487 [M-Glc-Fuc] ⁻
6	Сайкосапонин F ^а	19,88	927 [M-H] ⁻ , 781 [M-Rha] ⁻ , 765 [M-Glc] ⁻ , 619 [M-Glc-Rha] ⁻ , 457 [M-2×Glc-Rha] ⁻
7	Сайкосапонин С ^а	19,94	925 [M-H] ⁻ , 779 [M-Rha] ⁻ , 763 [M-Glc] ⁻ , 617 [M-Glc-Rha] ⁻ , 455 [M-2×Glc-Rha] ⁻
8	Сайкосапонин А ^а	21,43	779 [M-H] ⁻ , 617 [M-Glc] ⁻ , 599 [M-Glc-H ₂ O] ⁻ , 471 [M-Glc-Fuc] ⁻
9	Сайкосапонин В ₂ ^а	21,52	779 [M-H] ⁻ , 617 [M-Glc] ⁻ , 471 [M-Glc-Fuc] ⁻
10	Изомер сайкосапонина С ^б	21,79	925 [M-H] ⁻ , 763 [M-Hex] ⁻ , 617 [M-Hex-dHex] ⁻ , 455 [M-2×Hex-dHex] ⁻
11	Изомер сайкосапонина F ^б	21,88	927 [M-H] ⁻ , 765 [M-Hex] ⁻ , 619 [M-Hex-dHex] ⁻ , 457 [M-2×Hex-dHex] ⁻
12	Изомер сайкосапонина N ^б	22,41	941 [M-H] ⁻ , 779 [M-Hex] ⁻ , 633 [M-Hex-dHex] ⁻ , 471 [M-2×Hex-dHex] ⁻
13	Сайкосапонин D ^а	23,28	779 [M-H] ⁻ , 617 [M-Glc] ⁻ , 599 [M-Glc-H ₂ O] ⁻ , 471 [M-Glc-Fuc] ⁻
14	Изомер сайкосапонина А ^б	24,18	779 [M-H] ⁻ , 617 [M-Hex] ⁻ , 599 [M-Hex-H ₂ O] ⁻ , 471 [M-Hex-dHex] ⁻



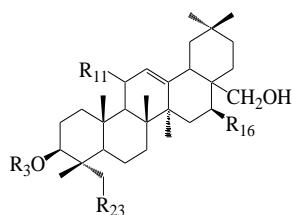
Тип 1
(производные олеан-11,13(18)-диен-28-ола)

1: R₃=(3'-β-D-Glc)-β-D-Fuc;
R₁₆=H; R₂₃=OH

3: R₃=(4'-α-L-Rha-6'-β-D-Glc)-β-D-Glc; R₁₆=α-OH; R₂₃=H

4: R₃=(4'-α-L-Rha-6'-β-D-Glc)-β-D-Glc; R₁₆=β-OH; R₂₃=OH

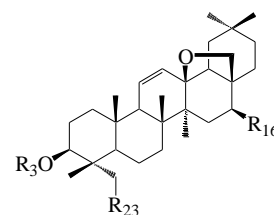
9: R₃=(3'-β-D-Glc)-β-D-Fuc;
R₁₆=α-OH; R₂₃=OH



Тип 2
(производные олеан-12-ен-16,28-диола)

5: R₃=(3'-β-D-Glc)-β-D-Fuc;
R₁₆=OH; R₁₁=α-OCH₃; R₂₃=OH

6: R₃=(4'-α-L-Rha-6'-β-D-Glc)-β-D-Glc; R₁₆=β-OH; R₁₁=R₂₃=H



Тип 3
(производные 13β,28-эпоксиолеан-11-ен-16-ола)

7: R₃=(4'-α-L-Rha-6'-β-D-Glc)-β-D-Glc; R₁₆=β-OH; R₂₃=H

8: R₃=(3'-β-D-Glc)-β-D-Fuc;
R₁₆=β-OH; R₂₃=OH

13: R₃=(3'-β-D-Glc)-β-D-Fuc;
R₁₆=α-OH; R₂₃=OH

^а Используются данные веществ сравнения; ^б использованы данные литературы; ^в Ac – ацетил, dHex – дезоксигексоза, Fuc – фукоза, Glc – глюкоза, GlcA – глюкуроновая кислота, Hex – гексоза, Rha – рамноза.

Количественное определение БАВ показало, что в надземных органах *B. scorzonerifolium* содержится органических кислот (титриметрия) – $6,49 \pm 0,13\%$, аскорбиновой кислоты (спектрофотометрия) – $0,50 \pm 0,02\%$, аминокислот (спектрофотометрия) – $0,75 \pm 0,03\%$, полисахаридов (гравиметрия) – $5,61 \pm 0,09\%$, сапонинов (спектрофотометрия) – $1,54 \pm 0,05\%$, эфирного масла (метод дистилляции) – $0,20 \pm 0,01\%$, окисляемых (дубильных) веществ (перманганатометрия) – $8,02 \pm 0,21\%$, дубильных веществ (спектрофотометрия) – $6,35 \pm 0,13\%$, фенолкарбоновых кислот в пересчете на 3-*O*-кофеилхинную кислоту (спектрофотометрия) – $4,86 \pm 0,10\%$, флавоноидов в пересчете на рутин (спектрофотометрия) – $4,39 \pm 0,08\%$, кумаринов в пересчете на эскулетин (фотоколориметрия) – $1,89 \pm 0,03\%$.

Методом МК-ВЭЖХ-УФ установлено, что доминирующими соединениями в надземных органах *B. scorzonerifolium* являются 5-*O*-кофеилхинная кислота – $11,29 \pm 0,26$ мг/г, кверцетин-3-*O*-глюкозид – $29,21 \pm 0,70$ мг/г (табл. 3).

Таблица 3 – Содержание фенольных соединений в надземных органах и экстракте сухом *B. scorzonerifolium*, мг/г

№	Соединение	Трава	Сухой экстракт
1	6- <i>O</i> -Кофеил-глюкоза	$0,40 \pm 0,01$	$1,40 \pm 0,03$
2	4- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота	$0,55 \pm 0,01$	$1,67 \pm 0,04$
3	5- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота	$11,29 \pm 0,26$	$36,65 \pm 0,76$
4	Кофейная кислота	$0,09 \pm 0,00$	$0,21 \pm 0,00$
5	1,3-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота	$0,68 \pm 0,01$	$1,82 \pm 0,04$
6	5- <i>O</i> -Ферулоилхинная кислота	$0,95 \pm 0,02$	$2,48 \pm 0,06$
7	Кверцетин-3- <i>O</i> -рутинозид	$1,91 \pm 0,04$	$3,92 \pm 0,10$
8	Кверцетин-3- <i>O</i> -глюкозид	$29,21 \pm 0,70$	$68,55 \pm 1,65$
9	Изорамнетин-3- <i>O</i> -рутинозид	$0,71 \pm 0,01$	$1,40 \pm 0,03$
10	3,5-Ди- <i>O</i> -кофеилхинная кислота	$5,98 \pm 0,14$	$12,14 \pm 0,29$
11	Изорамнетин-3- <i>O</i> -глюкозид	$3,09 \pm 0,08$	$9,00 \pm 0,23$
12	Кемпферол-3- <i>O</i> -рамнозид	$2,44 \pm 0,05$	$5,11 \pm 0,12$
Суммарное содержание соединений,		57,30	144,35
в том числе флавоноидов		37,36	87,98
фенилпропаноидов		19,94	56,37

В ходе изучения динамики накопления БАВ в *B. scorzonerifolium* установлено, что максимальное содержание дубильных (окисляемых) веществ отмечается в листьях и цветках, наименьшее количество содержится в стеблях. Максимальное количество флавоноидов и фенолкарбоновых кислот накапливается в листьях и цветках. Стебли накапливают этих соединений почти в три раза меньше, чем листья (рис. 1).

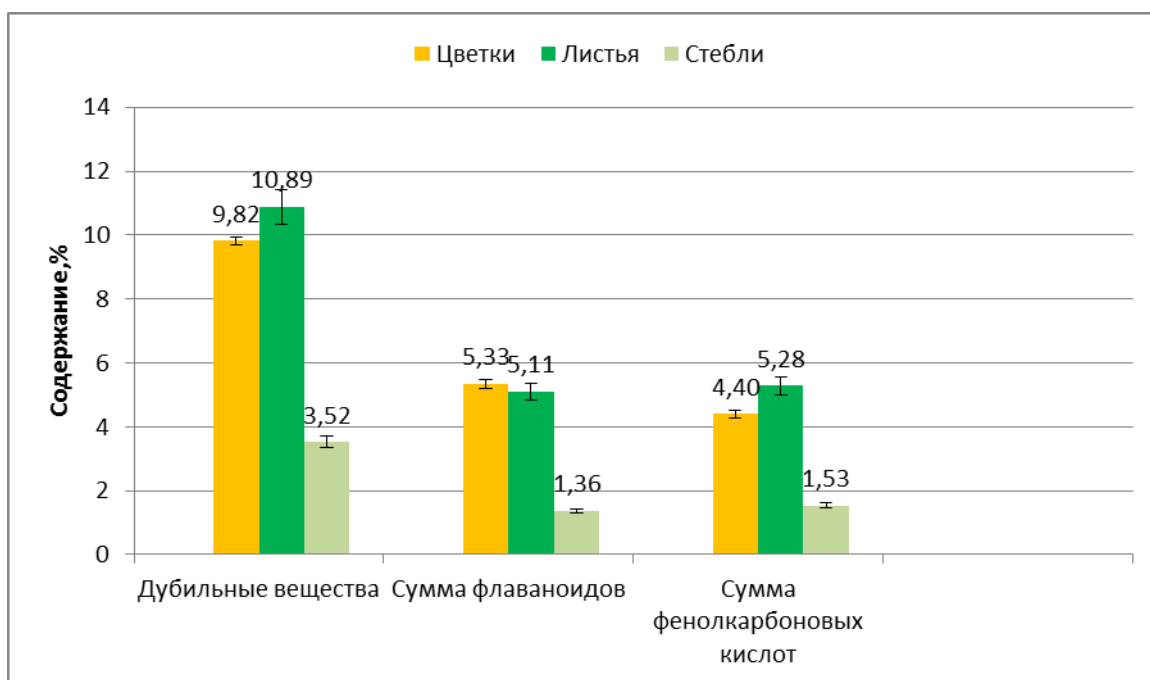


Рисунок 1 – Количественное содержание дубильных (окисляемых) веществ, суммы флавоноидов, суммы фенолкарбоновых кислот в надземных органах *B. scorzonerifolium* в период цветения.

Исследование влияния фазы вегетации на содержание БАВ показало их максимальное накопление в фазу цветения (рис. 2).

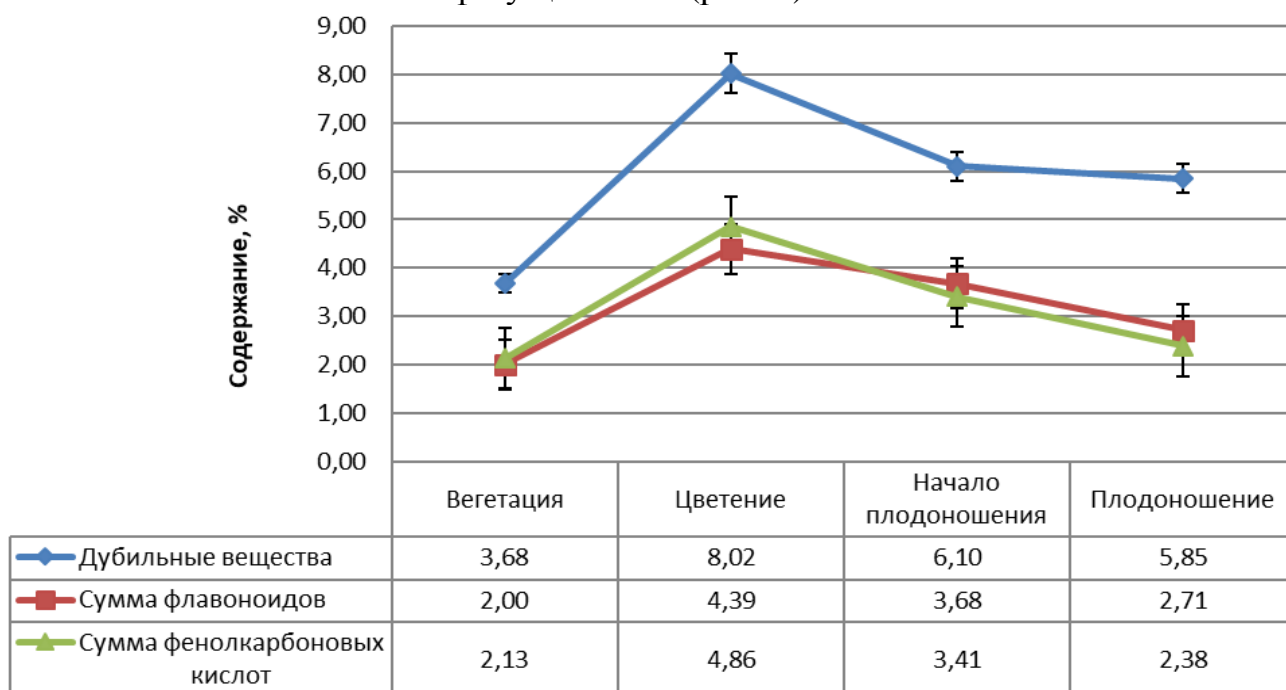


Рисунок 2 – Содержание дубильных (окисляемых) веществ, суммы флавоноидов, суммы фенолкарбоновых кислот (%) в надземных органах *B. scorzonerifolium* в зависимости от фазы вегетации.

Учитывая динамику накопления флавоноидов, фенолкарбоновых кислот и дубильных веществ в *B. scorzonerifolium* можно рекомендовать в качестве

лекарственного растительного сырья надземные органы – траву, заготовленную в период цветения.

Микроскопическое и ресурсное исследование

***Bupleurum scorzonerifolium* Willd.**

При микроскопическом исследовании установлены диагностические признаки сырья *B. scorzonerifolium* (рис. 3):

- эпидермис стеблевых листьев состоит из прямостенных многоугольных клеток с устьицами анизоцитного типа. Местами, особенно на верхней стороне листа, антиклинальные стенки клеток имеют четковидные утолщения (1). Клетки эпидермиса нижней стороны листа более мелкие (2). По краю листа клетки эпидермиса с сильно утолщенными наружными стенками и толстым кутикулярным слоем (3, 4);

- над крупными жилками листа клетки эпидермиса овальные, вытянутые, нередко с сильно утолщенными стенками, образуют длинные тяжи из 4-х рядов (5);

- жилки листа сопровождаются крупными млечниками (6);

- жилки сопровождаются механическими волокнами (7);

- эпидермис венчика цветка многоугольный прямостенный (8). Жилки сопровождаются млечниками с коричневым содержимым;

- эпидермис чашечки с толстым слоем кутикулы, под которым просматривается слой клеток механической ткани (9). Жилки сопровождаются многочисленными крупными млечниками, заполненными маслянистым зернистым содержимым (10, 11);

- цветоножки также пронизаны крупными млечниками с желтым и коричневым содержимым (12);

- эпидермальные клетки стебля прямоугольные с прямыми равномерно утолщенными стенками (13). Стебли пронизаны многочисленными крупными членистыми млечниками с желтым и коричневым содержимым (14);

- могут встречаться фрагменты плодов с проводящими пучками (15).

Установлены также анатомо-диагностические признаки для измельченного и порошкованного сырья *B. scorzonerifolium*.

Ресурсные исследования показали, что урожайность *B. scorzonerifolium* в Иркутской области составляет от $15,93 \pm 1,13$ г/м² до $30,28 \pm 2,38$ г/м². Возможный ежегодный объем заготовок с 7,3 га обследованных зарослей составляет 217,48 кг сырья *B. scorzonerifolium*.

Исследования по стандартизации сырья

«*Bupleuri scorzonerifolii herba*»

На основании исследований макро- и микроскопических признаков надземных органов *B. scorzonerifolium* составлено описание внешних и микроскопических признаков сырья для включения в проект ФС «*Bupleuri scorzonerifolii herba* – Володушки козелецелистной трава».

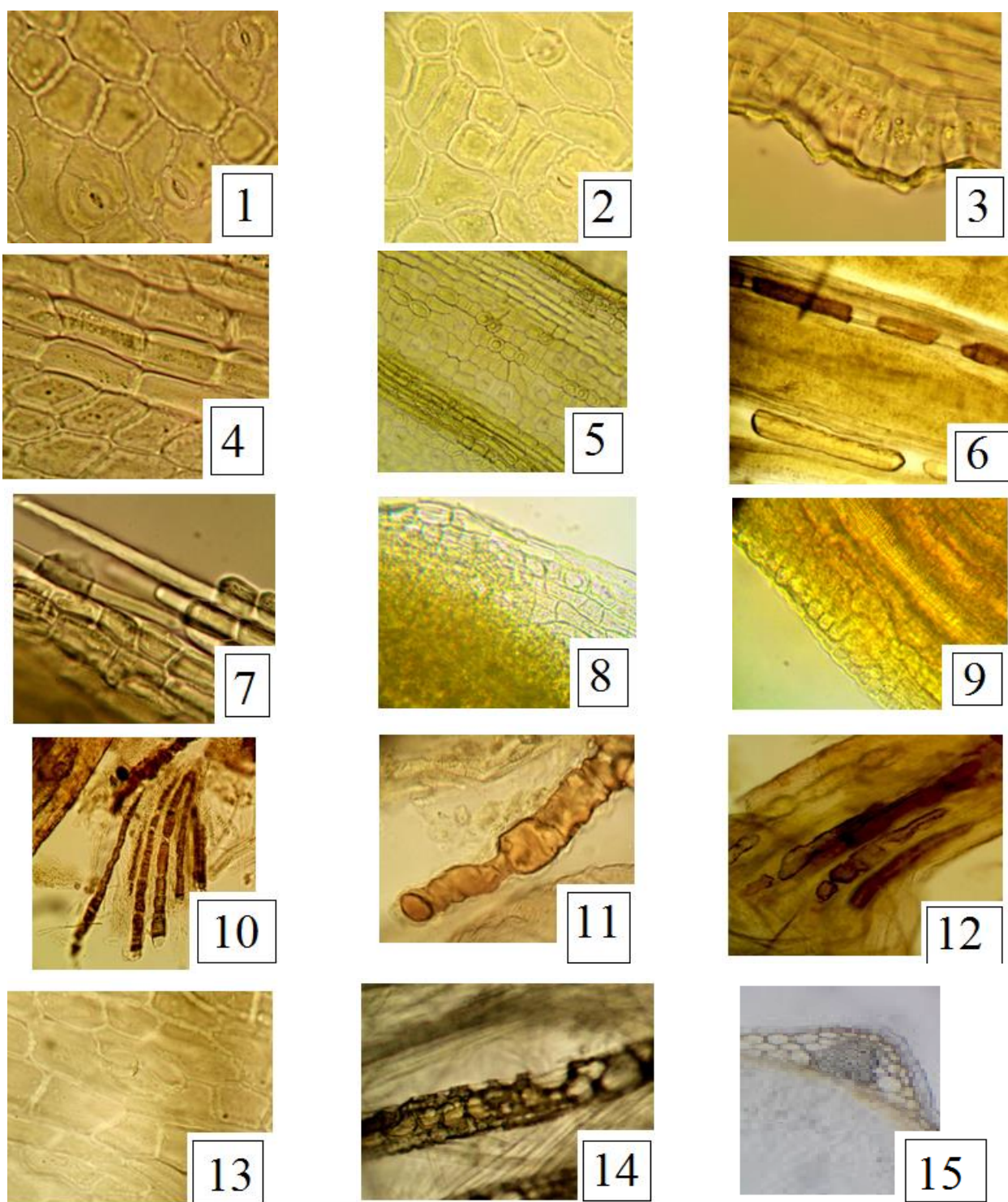


Рисунок 3 – Микроскопия *V. scorzonerifolium* травы:

1 – эпидермис листа (верхняя сторона) (250x); 2 – эпидермис листа (нижняя сторона) (250x); 3 – эпидермис края листа с толстым слоем кутикулы (250x); 4 – эпидермис листа с сильно утолщенными стенками (250x); 5 – тяжи из клеток эпидермиса с утолщенными стенками (100x); 6 – млечники по жилкам листа (200x); 7 – механические волокна жилки листа (250x); 8 – эпидермис венчика (100x); 9 – эпидермис чашечки (100x); 10 – основание чашечки с млечниками (100x); 11 – млечник чашечки цветка (250x); 12 – млечники цветоножки (150x); 13 – эпидермис стебля (250x); 14 – млечник стебля (200x); 15 – проводящий пучок плода (100x).

Для определения основных групп БАВ сырья предложены цианидиновая реакция и тонкослойная хроматография. На хроматограмме растворов СО должны обнаруживаться зоны: рутина (желто-зеленого цвета) и 3-*O*-кофеилхинной кислоты (зелено-голубого цвета). На хроматограмме испытуемого раствора должны обнаруживаться зоны адсорбции: зона желто-зеленого цвета на уровне зоны СО рутина; зона зелено-голубого цвета на уровне СО 3-*O*-кофеилхинной кислоты; ниже зоны СО рутина располагается зона желтого цвета; выше зоны СО рутина располагаются 2 зоны желто-зеленого цвета.

Для количественной оценки содержания суммы флавоноидов в сырье было предложено использовать метод дифференциальной спектрофотометрии. В качестве стандартного образца выбран СО рутина, т.к. его максимум поглощения в присутствии алюминия хлорида близок к максимуму поглощения спиртового извлечения из *B. scorzonerifolium* в присутствии алюминия хлорида (рис. 4).

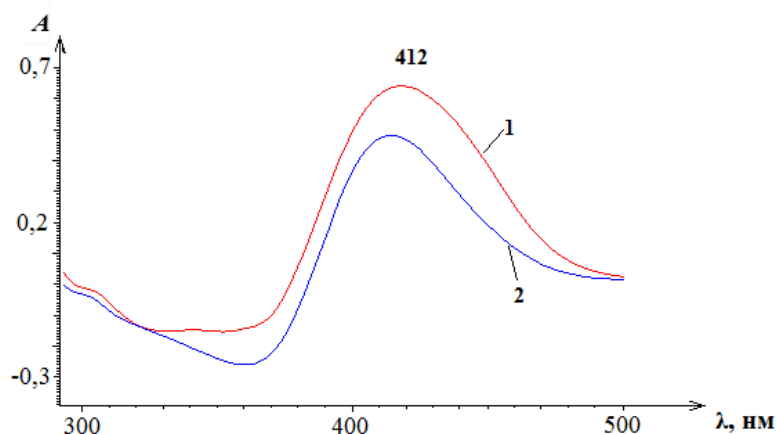


Рисунок 4 – Дифференциальные спектры в присутствии 2% спиртового раствора алюминия хлорида: 1 – спиртовое извлечение из травы *B. scorzonerifolium*, 2 – спиртовой раствор СО рутина.

При разработке методики количественного определения подобраны оптимальные условия анализа: экстрагент – 40% спирт этиловый, степень измельченности сырья – 1 мм, соотношение сырья и экстрагента – 1:100, время экстракции – 60 мин, комплексообразователь 2% спиртовой раствор алюминия хлорида в количестве 2 мл.

На основании проведённых 9 независимых определений количественного содержания суммы флавоноидов установлено, что ошибка методики составляет $\pm 2,96\%$ (табл. 4).

Таблица 4 – Метрологическая характеристика методики количественного определения суммы флавоноидов в траве *B. scorzonerifolium*

f	\bar{x}	S	$S\bar{x}$	P, %	t(P,f)	$\Delta\bar{x}$	\bar{E}
8	4,41	0,16979	0,05660	95	2,31	0,13	$\pm 2,96$

Аналитическая область методики от 4,81 до 19,83 мкг/мл, коэффициент корреляции 0,9998 (допускается $|r| \geq 0,98$), график зависимости оптической плотности от концентрации рутина описывается уравнением $y = 0,0229 \cdot x - 0,0028$.

Для количественной оценки содержания суммы фенолкарбоновых кислот в сырье был предложен метод спектрофотометрии с использованием удельного показателя поглощения 3-*O*-кофеилхинной кислоты в 95% спирте этиловом при 325 нм, равным 504,425. Оптимальные условия извлечения фенолкарбоновых кислот из сырья совпадают с предложенными условиями экстракции флавоноидов. На основании проведенных 9 независимых определений установлено, что ошибка методики составляет $\pm 2,28\%$.

Линейность методики сохраняется в интервале концентраций от 1,44 до 5,79 мкг/мл, коэффициент корреляции 0,9992 (допускается $|r| \geq 0,98$), график зависимости оптической плотности от концентрации 3-*O*-кофеилхинной кислоты описывается уравнением $y = 0,0779 \cdot x - 0,0014$.

Результаты валидации методик количественного определения суммы флавоноидов и суммы фенолкарбоновых кислот показали их соответствие по критериям: правильность, прецизионность, линейность, специфичность.

По результатам товароведческого анализа разработаны показатели качества сырья *B. scorzonerifolium*, которые включены в проект ФС (табл. 5).

Таблица 5 – Товароведческие показатели травы *B. scorzonerifolium*

Числовые показатели	Норма	
	цельное сырье	измельченное сырье
Содержание суммы флавоноидов в % (в пересчете на рутин)	Не менее 2,5	Не менее 2,5
Содержание суммы фенолкарбоновых кислот в % (в пересчете на 3- <i>O</i> -кофеилхинную кислоту)	Не менее 3	Не менее 3
Экстрактивные вещества (экстрагент вода очищенная)	Не менее 20	Не менее 20
Экстрактивные вещества (экстрагент спирт этиловый 60%)	Не менее 35	Не менее 35
Содержание влаги в сырье, %	Не более 13	Не более 13
Зола общая, %	Не более 10	Не более 10
Зола, нерастворимая в 10% растворе HCl, %	Не более 3	Не более 3
Содержание плодов, %	Не более 5	Не более 5
Другие части этого растения (корни, волокнистые остатки черешков прикорневых листьев), %	Не более 5	Не более 5
Побуревших и пожелтевших частей сырья, %	Не более 3	Не более 3
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0,5 мм	-	Не более 10
Частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм, %	Не более 5	-
Частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм	-	Не более 10
Органическая примесь, %	Не более 1	Не более 1
Минеральная примесь, %	Не более 1	Не более 1

При изучении сроков годности стабильность показателей качества сырья сохранялась в течение 2,5 лет.

Разработка технологии получения и стандартизация экстракта сухого *Bupleurum scorzonerifolium*

Сухие экстракты широко применяются в фармации, т.к. являются наиболее рациональной формой переработки лекарственного растительного сырья.

Предложен способ получения экстракта сухого методом трёхступенчатой экстракции в динамических условиях. Установлены оптимальные параметры получения экстракта сухого: экстрагент – 60% спирт этиловый на первой и второй ступени экстракции и 70% спирт этиловый – на третьей ступени экстракции; размер частиц сырья – 2 мм; соотношение сырья и экстрагента 1:14; температура экстракции 60 °С; продолжительность ступеней экстракции: 1-я ступень – 120 мин, 2-я ступень – 60 минут, 3-я ступень – 30 мин. Эффективность экстракции составила – 83,46% (по экстрактивным веществам), 93,34% (по сумме флавоноидов), 78,67% (по сумме фенолкарбоновых кислот).

Изучение БАВ экстракта сухого *B. scorzonerifolium* показало присутствие дубильных веществ, флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, сапонинов, высокомолекулярных жирных кислот, макро-, микро- и ультрамикроразнообразных элементов, аминокислот. По качественному составу экстракт сухой соответствует сырью *B. scorzonerifolium*, отличия заключаются в более высоком количественном содержании БАВ (табл. 3).

Для стандартизации экстракта сухого предложены качественная реакция (цианидиновая проба), тонкослойная хроматография.

С целью соблюдения принципа сквозной стандартизации для количественного определения суммы флавоноидов и суммы фенолкарбоновых кислот в экстракте сухом использовали методики, предложенные для стандартизации сырья *B. scorzonerifolium*. Относительная ошибка методики определения суммы флавоноидов не превышала $\pm 2,82\%$, суммы фенолкарбоновых кислот – не более $\pm 2,51\%$ (табл. 6).

Таблица 6 – Метрологические характеристики методик количественного определения суммы флавоноидов и суммы фенолкарбоновых кислот в экстракте сухом *B. scorzonerifolium*

f	\bar{x}	S	$S_{\bar{x}}$	P, %	t (P,f)	$\Delta\bar{x}$	\bar{E}
<i>Флавоноиды</i>							
8	12,10	0,44422	0,14807	95	2,31	0,34	$\pm 2,82$
<i>Фенолкарбоновые кислоты</i>							
8	10,29	0,33656	0,11219	95	2,36	0,26	$\pm 2,51$

Методики валидированы и соответствуют критериям правильность, прецизионность, специфичность и линейность.

По результатам анализа 5 серий экстракта сухого определены нормы содержания суммы флавоноидов – «не менее 10,0%»; суммы фенолкарбоновых кислот – «не менее 8,0%».

По результатам исследования стабильности экстракта сухого *B. scorzonerifolium* в процессе хранения установлен срок годности – 2 года.

На основании полученных результатов разработаны числовые показатели экстракта сухого *B. scorzonerifolium*, который представляет собой гигроскопичный порошок коричневого или темно-коричневого цвета, со специфическим ароматным запахом: потеря в массе при высушивании не более 5%, тяжелых металлов не более 0,01%.

Проведенные фармакологические исследования показали, что экстракт сухой *B. scorzonerifolium* обладает желчегонной, противовоспалительной и антиоксидантной активностью.

ВЫВОДЫ

1. Проведено исследование надземной части *B. scorzonerifolium*, произрастающей в Прибайкалье. При изучении химического состава идентифицировано 24 флавоноида, производных кверцетина, кемпферола, изорамнетина, из них 13 соединений описаны впервые. Установлено содержание 12 фенолкарбоновых кислот (7 из которых обнаружены впервые), эпикатехина, катехина, эпигаллокатехингаллата, кумарина, эскулетина. Впервые изучен метаболомный профиль тритерпеноидов, идентифицировано 14 тритерпеновых гликозидов (сайкосапонинов А, В₂, С, D, ВК₁, М, N, F и их изомеров; буплевроза VI). В составе эфирного масла выявлено присутствие 33 компонентов, впервые для *B. scorzonerifolium* установлено содержание β-гвайена, аромадендрена, ледена оксида. Свободные аминокислоты представлены 7 соединениями, среди которых незаменимые – лизин, треонин, валин. Идентифицировано 17 высокомолекулярных жирных кислот, среди которых преобладают линолевая и α-линоленовая кислоты. Определено содержание 9 макро-, 63 микро- и ультрамикроэлементов.

2. Дана оценка количественного содержания в надземных органах *B. scorzonerifolium* органических кислот, дубильных веществ, фенолкарбоновых кислот, флавоноидов, кумаринов, сапонинов, аминокислот. Определено количественное содержание 5 флавоноидов и 7 фенолокислот. Впервые изучена динамика накопления биологически активных веществ по органам и фазам вегетации. На основании полученных данных в качестве лекарственного растительного сырья предложена трава *B. scorzonerifolium*, обоснованы сроки заготовки сырья – период цветения.

3. Для определения подлинности сырья *B. scorzonerifolium* (цельного, измельченного и порошка) установлены его макро- и микроскопические признаки, предложены методики анализа с применением качественных реакций и ТСХ. Определены урожайность и запасы сырья *B. scorzonerifolium*.

4. Для стандартизации сырья *B. scorzonerifolium* адаптированы методики количественного определения суммы флавоноидов в пересчете на рутин и суммы фенолкарбоновых кислот в пересчете на 3-О-кофеилхинную кислоту. Методики валидированы и соответствуют критериям правильность, прецизионность, специфичность и линейность. Установлены числовые показатели качества сырья, включенные в проект ФС «Володушки козелецелистной трава».

5. Разработана технология получения экстракта сухого *B. scorzonerifolium* методом трёхступенчатой экстракции в динамических условиях. Исследование химического состава экстракта сухого показало его соответствие сырью *B. scorzonerifolium*. Проведена стандартизация экстракта сухого, в результате установлены показатели подлинности и доброкачественности. Предложены и валидированы методики количественного определения суммы флавоноидов и суммы фенолкарбоновых кислот. Разработанные числовые показатели и нормы качества экстракта сухого *B. scorzonerifolium* включены в проект ФСП «Володушки козелецелистной экстракт сухой».

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Мирович, В.М. Микроскопическое строение надземных органов володушки козелецелистной, произрастающей в Прибайкалье / В.М. Мирович, С.А. Петухова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической подукции: сборник научных трудов. – Пятигорск, 2016. – Вып. 71. – С. 43-45.
2. Мирович, В.М. Состав биологически активных веществ володушки козелецелистной (*Bupleurum scorzonerifolium* Willd.) травы, произрастающей в Восточной Сибири / В.М. Мирович, С.А. Петухова // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической подукции: сборник научных трудов. – Пятигорск, 2016. – Вып. 71. – С. 57-59.
3. Петухова, С.А. Флавоноиды надземных органов растений рода *Bupleurum* L., произрастающих в Прибайкалье / С.А. Петухова // Актуальные вопросы современной медицины: материалы 83-й Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием. – Иркутск, 2016. – С. 381.
4. Петухова, С.А. Содержание дубильных веществ в надземных органах *Bupleurum scorzonerifolium* Willd. / С.А. Петухова // Актуальные вопросы современной медицины: материалы 83-й Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием. – Иркутск, 2016. – С. 383.
5. Петухова, С.А. Элементный состав экстракта сухого из травы володушки козелецелистной / С.А. Петухова, В.М. Мирович // Инновационные технологии в фармации: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной 75-летию со дня образования фармацевтического факультета Иркутского государственного медицинского университета. – Иркутск, 2016. – С.199-204.
6. Петухова, С.А. Содержание флавоноидов в володушке козелецелистной, произрастающей в Прибайкалье / С.А. Петухова, В.М. Мирович // Фармацевтический кластер как интеграция науки, образования и производства: сборник материалов 6-й международной научно-практической конференции. – Белгород, 2016. – С. 112-114.
7. Петухова, С.А. Фармакогностическое исследование надземных органов володушки козелецелистной (*Bupleurum scorzonerifolium* Willd.), произрастающей

в Восточной Сибири / С.А. Петухова, В.М. Минович // Сборник материалов IV Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Инновации в здоровье нации». – Санкт-Петербург, 2016. – С. 486-489.

8. Петухова, С.А. Фенолкарбоновые кислоты надземных органов володушки козелецелистной (*Bupleurum scorzonerifolium* Willd.), произрастающей в Прибайкалье / С.А. Петухова, В.М. Минович // Республиканский научный журнал «VESTNIK». – 2016. - Том 4, №4 (77). — С. 23-25.

9. Петухова, С.А. Флавоноиды представителей рода *Bupleurum* L. южных районов Центральной Сибири / С.А. Петухова, А.А. Посохина, И.В. Карсунова // Республиканский научный журнал «VESTNIK». – 2016. - Том 4, №4 (77). — С. 96-97.

10. Минович, В.М. Изучение элементного состава надземных органов володушки козелецелистной (*Bupleurum scorzonerifolium* Willd.), произрастающей в Прибайкалье / В.М. Минович, С.А. Петухова // Вестник Восточно-Сибирского государственного университета технологий и управления. – 2017. - №1 (64). – С.39-43.

11. Минович, В.М. Накопление фенольных соединений в надземных органах *Bupleurum scorzonerifolium* Willd, произрастающей в Прибайкалье / В.М. Минович, С.А. Петухова, Л.В. Дударева // Acta Biomedica Scientifica. – 2017. – №3. – С. 78-81.

12. Минович, В.М. Изучение состава фенольных соединений володушки козелецелистной (*Bupleurum scorzonerifolium* Willd.), произрастающей в Прибайкалье, методом ВЭЖХ / В.М. Минович, С.А.Петухова, Л.В. Дударева // Acta Biomedica Scientifica. – 2017. – №3. – С. 75-77.

13. Петухова, С.А. Разработка методики количественного определения суммы флавоноидов в траве володушки козелецелистной / С.А. Петухова, В.М. Минович // Медицинский альманах. – 2017. - №3 (48). – С. 203-205.

14. Минович, В.М. Исследование компонентного состава эфирного масла надземных органов володушки козелецелистной, произрастающей в Прибайкалье / В.М. Минович, С.А. Петухова, Л.В. Дударева, Н.А. Соколова // Медицинский альманах. – 2017. - №5 (50). – С. 165-167.

15. Петухова, С.А. Разработка способа получения экстракта сухого из травы володушки козелецелистной / С.А. Петухова, В.М. Минович // Аспирантский вестник Поволжья. – 2017. - № 1-2. – С. 218-220.

16. Петухова, С.А. Разработка показателей и норм качества травы володушки козелецелистной / С.А. Петухова, В.М. Минович, Г.И. Бочарова // Инновационные технологии в фармации: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, посвященной памяти Маняка В. А. – Иркутск, 2017. – С.138-142.

17. Петухова, С.А. Микроскопические диагностические признаки порошка *Bupleurum scorzonerifolium* травы / С.А. Петухова // Актуальные вопросы современной медицины: материалы 85-й Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием. – Иркутск, 2018. – С. 462.

18. Патент № 2665968. Российская Федерация. Способ получения средства, обладающего желчегонной, противовоспалительной и антиоксидантной активностью / В.М. Мирович, С.А. Петухова, А.В. Цыренжапов. - № 2017123113; заявл. 29.06.2017; опубл. 05.09.2018. – Бюл. № 25.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАВ – биологически активные вещества

БХ – бумажная хроматография

ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография

ГФ – Государственная фармакопея

МК-ВЭЖХ-УФ – микроколоночная высокоэффективная жидкостная хроматография с ультрафиолетовым детектированием

РФ – Российская федерация

СО – стандартный образец

ТСХ – тонкослойная хроматография

УВЭЖХ-ДМД-ИЭР-МС – ультравысокоэффективная жидкостная хроматография с диодноматричным и масс-спектрометрическим детектированием

ФС – фармакопейная статья

ФСП – фармакопейная статья предприятия

ЭГКГ – эпигаллокатехингаллат