

На правах рукописи



УРБАГАРОВА БАЯРМА МУНХОЕВНА

**ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ САПОЖНИКОВИИ
РАСТОПЫРЕННОЙ (*SAPOSHNIKOVIA DIVARICATA* (TURCZ.)
SCHISCHKIN) КОРНЕЙ И РАЗРАБОТКА НА ИХ ОСНОВЕ
ЭКСТРАКТА СУХОГО**

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Улан-Удэ – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Байкальский институт природопользования Сибирского отделения Российской академии наук и Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова»

Научный руководитель:

Тараскин Василий Владимирович – кандидат фармацевтических наук

Официальные оппоненты:

Коломиец Наталья Эдуардовна – доктор фармацевтических наук, доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации / кафедра фармакогнозии с курсами ботаники и экологии, 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 «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита состоится «10» декабря 2019 г. в 15.00 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 «08» октября 2019 г.

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

 Хобракова Валентина Бимбаевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы

Социальное благополучие общества во многом зависит от состояния здоровья его индивидуумов. В топ-10 ведущих причин смертей во всем мире входят ишемическая болезнь сердца, ВИЧ/СПИД, онкологические, нейродегенеративные и инфекционные заболевания. Задача охраны здоровья решается различными способами, включающими внедрение высоких технологий в медицинскую диагностику, разработку новых способов профилактики и создание новых эффективных лекарственных средств. Анализ, проведенный Ньюманом и Креггом, показал, что порядка 49% всех лекарственных средств фактически представляют собой природные соединения, либо соединения, непосредственно, полученные из них путем химических трансформаций (Newman D.J. и др., 2016). Ценным источником вторичных метаболитов остаются растения, продуцирующие различные группы фармакологически активных веществ. Одним из перспективных для внедрения в отечественную медицину видов, активно используемых в практике традиционных медицинских систем, является сапожниковия растопыренная *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischkin (Apiaceae). В Китае, Корее и Японии корни растения используются в качестве эффективного противовоспалительного средства для лечения артралгии, ревматизма, генерализованных и головных болей, при инсультах, лихорадке, простудных заболеваниях и аллергических ринитах, а также как анальгезирующее, противопаркинсоническое в составе многокомпонентных сборов (Kreiner J. и др., 2017). Сапожниковия растопыренная, произрастающая на территории России, ранее не изучалась. Учитывая высокую биологическую активность вида, распространение на территории Забайкалья и Монголии, а также возможности плантационного культивирования, актуальным является его всестороннее изучение с целью внедрения в отечественную научную медицину. Кроме того, данное исследование соответствует стратегии развития российского здравоохранения, реализуемого, в том числе, в рамках государственной программы «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности» в области импортозамещения лекарственных средств, направленного на увеличение доли лекарственных средств отечественного производства (ПП РФ №305 от 15.04.14).

Степень разработанности темы исследования

Первые исследования по химическому составу *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischkin были проведены в 1965 г. отечественным ученым Пименовым М.Г., в результате чего выявлено наличие кумаринов (Пименов, М.Г. и др., 2012). В 1980х годах японскими учеными выделены и охарактеризованы хромоны, полиацетиленовые соединения и кумарины (Jin G. и др., 1982; Sasaki H. и др., 1982). Последующие исследования были

посвящены изучению хромонов (Zhao В. и др., 2010; Kim М.К. и др., 2011; Scherubl R. и др., 2013; Kim H.S. и др., 2017), кумаринов (Kim М.К. и др., 2011; Li Y-Y. и др., 2013), полиацетиленовых соединений (Christensen L.P. и др., 2011), полисахаридов (Shimizu N. и др., 1989; Shimizu N. и др., 1989; Dong С-X. и др., 2018), выделению индивидуальных веществ из корней *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischkin (Sasaki H. и др., 1982; Jin G. и др., 1992; Okuyama E. и др., 2001; Jiang Y.Y. и др., 2007; Liu R. и др., 2008; Zhao В. и др., 2010; Yang J-L. и др., 2015) произрастающих на территории Китая, Кореи, Японии. В России, где отмечается западная граница ареала сапожниковии растопыренной, химический состав указанного вида не изучался. Имеющиеся сведения об использовании корней сапожниковии растопыренной в традиционной медицине, разнообразие их вторичных метаболитов, определили векторы фармакологических исследований. На моделях *in vivo* и *in vitro* выявлены противовоспалительная (Chin Y-W. и др., 2011; Chen N. и др., 2013; Khan S. и др., 2013; Kong X. и др., 2013; Chang Ch. и др., 2015; Yang J-M. и др., 2016; Wang X. и др., 2017; Jiang H. и др., 2018; Han В. и др., 2019), противоаллергическая (Yu X. и др., 2015), антимикробная (Zhang L. и др., 2013; Kim M. и др., 2018), антиоксидантная (Wang Ch-Ch. и др., 1999; Tai J. и др., 2008; Kim M. и др., 2018), антипролиферативная (Kang J-S. и др., 2014; Zhang L. и др., 2017), обезболивающая (Okuyama E. и др., 2001; Kim S.H. и др., 2017) активности. Часть публикаций посвящена разработке селективной методики определения хромонов в экстрактах, биологических средах, в составе сборов (Dai J.A. и др., 2008; Du K. и др., 2009; Li W. и др., 2010; Xin Y-Y. и др., 2010; Kim М.К. и др., 2011; Zheng Zh-G. и др., 2011; Yan Zh. и др., 2011; Wang Y. и др., 2012; Li Y-Y. и др., 2013; Scherubl R. и др., 2013; Li L. и др., 2015; Han Zh. и др., 2017; Jia M-Q. и др., 2017; Kim H.S. и др., 2017), а также выбору оптимального метода экстракции (Li W. и др., 2010; Han Zh-M. и др., 2015). Учитывая ценность изучаемого вида растения, в последнее время ведутся исследования по его интродукции (Qiao Q. и др., 2009; Neuberger H. и др., 2010; Jiang H. и др., 2018). В 2017 г. опубликована научная статья по обзору фитохимических, фармакологических и фармакокинетических данных *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischkin (Kreiner J. и др., 2017).

Цель и задачи исследования

Целью работы является фармакогностическое исследование *Saposhnikovia divaricatae radices* и разработка на их основе экстракта сухого. Для достижения цели необходимо решить следующие **задачи**:

1. Изучить химический состав биологически активных веществ (БАВ) *Saposhnikovia divaricatae radices*;
2. Определить внешние и микроскопические признаки сырья – *Saposhnikovia divaricatae radices*;

3. Разработать методику количественного определения действующих веществ – хромонов и провести её валидацию;

4. Определить показатели качества и нормы содержания основных биологически активных веществ, разработать нормативную документацию на лекарственное растительное сырье;

5. Разработать способ получения и показатели качества экстракта сухого. Подготовить нормативную документацию на экстракт сухой.

Научная новизна работы

Впервые проведен комплексный фармакогностический анализ сапожниковии растопыренной корней флоры Бурятии, Забайкальского края и Монголии.

В ходе изучения химического состава выявлено наличие хромонов, кумаринов, эфирных масел, флавоноидов, дубильных веществ, жирных кислот, полиацетиленовых соединений, витамина Е, полисахаридов. Показано, что растение *Saposhnikovia divaricata* является ценным источником хромонов – цимифугина, гамаудола и их гликозидов. Цимифугин, гамаудол, 5-О-метилвисамминол и гликозиды: *перв*-О-глюкозилцимифугин, *втор*-О-глюкозилгамаудол, 4'-О-β-D-глюкозил-5-О-метилвисамминол выделены в индивидуальном виде. Дополнительно выделены следующие кумарины: скополетин, бергаптен, изоимператорин, мармезин, декурсинол, оксипеucedанин гидрат и (-)-прерупторин В. Структура прерупторина В подтверждена данными РСА. Для выделенных веществ, впервые получены данные по цитотоксичности индивидуальных соединений на моделях опухолевых клеток человека: MEL-8, U-937, DU-145, MDA-MB-231, BT-474. Определен компонентный состав эфирного масла, основными компонентами которого являются панаксинол (синонимы фалькаринол, каротатоксин) [3(R)-(9Z)-гепта-1,9-диен-4,6-диин-3-ол] и β-бисаболен. Впервые изучен состав высших жирных кислот: доминирующими кислотами являются линолевая (34.53–48.49%), олеиновая (8.85–30.33%), пальмитиновая (6.15–18.30%). Определено суммарное содержание флавоноидов, которое составило 0.29–0.48%. Содержание дубильных веществ в корнях колеблется от 0.38% до 0.55%. Изучен элементный состав.

Впервые в сапожниковии растопыренной корнях из флоры Бурятии, Забайкальского края, Монголии и в культивированном сырье, методом ВЭЖХ-УФ, определено количественное содержание основных действующих веществ *перв*-О-глюкозилцимифугина, цимифугина и 4'-О-β-D-глюкозил-5-О-метилвисамминола, которое составило соответственно: 0.13 – 5.22 мг/г; 0.01 – 1.82 мг/г; 0.98 – 3.25 мг/г от массы воздушно сухого сырья (в.с.с.).

Разработан способ получения экстракта сухого из корней сапожниковии растопыренной, для которого установлена выраженная церебропротекторная активность (100 мг/кг) на модели ишемии головного мозга у крыс.

Практическая значимость

На основе проведенных исследований разработаны и предложены:

- проект Фармакопейной статьи (ФС) *Saposhnikoviae divaricatae radices*;
- проект Фармакопейной статьи (ФС) *Saposhnikoviae divaricatae radices extractum siccum*;
- методика количественного определения хромонов и методические рекомендации по макро- и микроскопическому изучению *Saposhnikoviae divaricatae radices* внедрены в учебный процесс на кафедре фармации медицинского института ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова»;
- способ получения *Saposhnikoviae divaricatae radices extractum siccum* внедрен в учебный процесс на кафедре фармации медицинского института ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова».

Методология и методы исследования

Для проведения фармакогностического анализа *Saposhnikoviae divaricatae radices* осуществлены макроскопический и микроскопический анализы, фитохимические и фармакологические исследования. В работе использованы реактивы, растворители и стандарты, отвечающие требованиям соответствующей нормативной документации. Микроскопический анализ сырья проводили на оптическом микроскопе с системой визуализации MicroVizor (ОАО «Ломо»). Фитохимические исследования проводились с использованием хроматографических (газовая хроматография с масс-спектрометрическим детектированием, высокоэффективная жидкостная хроматография, колоночная хроматография, флеш-хроматография) и спектральных методов анализа (атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно-связанной плазмой, атомно-абсорбционная спектроскопия, ЯМР-спектроскопия, масс-спектрометрия высокого разрешения, дифрактометрия).

На защиту выносятся:

- химический состав биологически активных веществ (БАВ) *Saposhnikoviae divaricatae radices*;
- макроскопическое и микроскопическое исследование *Saposhnikoviae divaricatae radices*;
- разработанная методика количественного определения действующих веществ – хромонов и её валидация;
- способ получения экстракта сухого из *Saposhnikoviae divaricatae radices*;
- проекты фармакопейных статей «*Saposhnikoviae divaricatae radices*» и «*Saposhnikoviae divaricatae radices extractum siccum*».

Личный вклад автора

Автором диссертационной работы проведен обзор научной литературы, на основании которого были сформулированы цель и задачи диссертационного исследования, составлен план, проведены экспериментальные исследования, а также анализ полученных результатов. Автором самостоятельно были подготовлены научные статьи, тезисы, доклады для участия в конференциях различного уровня, автореферат и диссертация, представленные к защите.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Научные положения диссертационной работы соответствуют паспорту специальности 14.04.02 – «фармацевтическая химия, фармакогнозия». Результаты проведенных исследований соответствуют пунктам 2,3,6 паспорта специальности.

Связь темы исследования с проблемным планом фармацевтических наук

Работа выполнена в соответствии с программой и планом научно-исследовательской работы ФГБУН Байкальский институт природопользования СО РАН (проект №0339-2016-0003 «Трансформация веществ в адаптивных реакциях организмов как индикатор антропогенного воздействия в экосистемах Азиатской России и сопредельных территорий») и кафедры фармации медицинского института ФГБОУ ВО «Бурятский государственный университет имени Доржи Банзарова» (Проектная часть государственного задания в сфере научной деятельности, проект №19.1168.2014/К «Исследование низкомолекулярных метаболитов растений флоры Северной Азии и создание с использованием традиций восточной медицины новых лекарственных средств широкого спектра действия»), а также в рамках проекта РФФИ №17-33-50176 «Разработка способов получения алкинилзамещенных дигидропирано- и дигидрофухромонов и синтез азотсодержащих производных с помощью катализируемых соединениями меди реакций Манниха и 1,3-диполярного циклоприсоединения»).

Апробация результатов исследования

Материалы диссертационной работы доложены и обсуждены на конференциях различного уровня: Международный симпозиум «Актуальные проблемы химии, биологии и технологии природных соединений» (Республика Узбекистан, Ташкент, 2017 г), Международная конференция молодых ученых «Наука и технологии: Байкал-2018» (Россия, Иркутск, 2018 г), "Research Innovation - 2019" (Монголия, Улан-Батор, 2019 г), XII международная научная конференция «Окружающая среда и устойчивое развитие Монгольского плато и сопредельных территорий» (Россия, Улан-Удэ, 2017 г), Всероссийский научно-практический семинар с международным участием «Редкие растения и фитоценозы Байкальского

региона и сопредельных территорий» (Россия, Улан-Удэ, 2016 г), VIII Школа-семинар молодых ученых России, посвященная 25-летию БИП СО РАН (Россия, г. Улан-Удэ, 2016 г), Всероссийская международная молодежная научная конференция «Экологобезопасные и ресурсосберегающие технологии и материалы» (Россия, Улан-Удэ, 2017 г), Ежегодная научно-практическая конференция преподавателей, сотрудников и аспирантов Бурятского государственного университета (2016-2018 гг).

Публикации

По результатам исследования опубликовано 12 научных работ, в том числе 2 статьи в периодических изданиях, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 162 страницах машинописного текста и состоит из введения, пяти глав, общих выводов и 10 приложений. Работа иллюстрирована 28 рисунками и 33 таблицами. Список цитируемой литературы включает 136 источников, из них 95 на иностранных языках.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектами исследования явились образцы сапожниковии растопыренной корня, собранные в различные периоды развития растения в Иволгинском, Тарбагатайском, Мухоршибирском, Кяхтинском, Джидинском районах Республики Бурятия и в Кыринском и Агинском районах Забайкальского края Российской Федерации; в Хэнтэйском аймаке Монголии, а также в качестве объекта исследования послужили сапожниковии растопыренной корня, приобретенные в аптечном учреждении г. Сининь провинции Цинхай КНР в 2014-2018 гг. и культивируемое сырьё. Сбор травы проводили в фазу цветения со второй половины июля до первой половины августа, сбор корней осуществляли в период отмирания надземной части в сентябре. Образцы после сбора высушивали в затененном месте до воздушно-сухого состояния, упаковывали в полотняные мешки и хранили в темноте при комнатной температуре.

Микропрепараты исследовали на оптическом микроскопе с системой визуализации (MicroVizor ОАО «Ломо»).

Качественное обнаружение основных классов биологически активных соединений растения проводили согласно общепринятым методикам. Для исследования химического состава липидной фракции и эфирных масел применяли метод газовой хроматографии с масс-спектрометрическим детектированием (ГХ/МС) на газовом хроматографе Agilent 7890 с тройным квадрупольным масс-спектрометром 7000 С в качестве детектора (Agilent Technologies, США). Использовали 30-метровую кварцевую колонку HP-5MS с внутренним диаметром 0.25 мм. Газ-носитель – гелий (постоянный поток

1.0 мл/мин). Ионизация: электронный удар (70 эВ). Диапазон сканирования 50 – 750 а.е.м. Процентный состав жирных кислот вычисляли по площадям газо-хроматографических пиков с помощью программы MassHunter B.06.00. без учёта корректирующих коэффициентов. Качественный анализ основан на сравнении времен удерживания и полных масс-спектров соответствующих чистых соединений с использованием библиотеки данных NIST14 и стандартных смесей Bacterial Acid Methyl Esters (CP Mix, Supelco, Bellefonte, PA, USA) и Fatty Acid Methyl Esters (Supelco 37 comp. FAME Mix 10 mg/ml in CH₂Cl₂). Качественный анализ компонентов эфирного масла основан на сравнении времен удерживания и полных масс-спектров соответствующих чистых соединений библиотеки хромато-масс-спектрометрических данных летучих веществ растительного происхождения (Ткачёв А.В., 2008) с полученными данными. Процентное содержание вычисляли по площадям газо-хроматографических пиков без корректирующих коэффициентов. Для анализа количественного содержания суммы флавоноидов измеряли оптическую плотность водно-этанольных извлечений на спектрофотометре ПЭ-5400УФ в кюветах с толщиной слоя 10 мм.

Определение количественного содержания хромонов осуществляли на высокоэффективном жидкостном хроматографе с УФ-детектированием Agilent 1200 (Agilent Technologies, США) с диодно-матричным детектором. Разделение осуществляли с помощью колонки Zorbax Eclipse XDB-C18 (4.6*150мм, 5 мкм). Подвижная фаза состояла из водного растворителя А – вода и неводного растворителя Б – метанол, скорость потока составила 1,0 мл/мин. Режим элюирования – градиентный. Объем пробы – 5 мкл раствора и температура колонки 30°C. Аналитическая длина волны – 300 нм. При определении внутрилабораторной воспроизводимости анализ производили на высокоэффективном жидкостном хроматографе Милихром А-02 (Эконова, Россия) с УФ-детектором. Колонка ProntoSil-120-5-C18 (2*75 мм, 5 мкм).

Величины удельного вращения измеряли на поляриметре PolAAR 3005. Температуры плавления определяли на нагревательном столике Stuart SMP30. ИК-спектры регистрировали на приборе «Vector-22». УФ-спектры поглощения записывали на спектрометре HP 8453 UV Vis в этаноле.

Исследование элементного состава осуществляли на атомно-абсорбционном спектрометре Solaar 6M (ThermoScientific, США), оснащённым электротермическим атомизатором FS90 и ртутно-гидридной приставкой VP-100 и атомно-эмиссионном спектрометре с индуктивно-связанной плазмой Profile Plus (Teledyne, США).

Выделение индивидуальных соединений проводили методом колоночной хроматографии на силикагеле (4×330 см, 0.063-0.200 мм) элюированием смесью CHCl₃-EtOH (v/v=100:0, 100:1, 50:1, 20:1, 10:1, 5:1 до 0:1).

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C растворов соединений в CDCl_3 измеряли на спектрометрах Bruker AV-400 (рабочие частоты 400.13 (^1H) и 100.78 МГц (^{13}C)), Bruker DRX-500 (рабочие частоты 500.13 (^1H) и 125.76 МГц (^{13}C)) и Bruker AV-600 (рабочие частоты 600.30 (^1H) и 150.96 МГц (^{13}C), относительно SiMe_4 . Для отнесения сигналов в спектрах ЯМР использовали различные типы протон-протонной и углерод-протонной сдвиговой корреляционной спектроскопии (COSY, COXH, COLOC). Мультиплетность сигналов в спектрах ЯМР ^{13}C определяли при записи спектров в режиме J-модуляции. Масс-спектры высокого разрешения записаны на масс-спектрометре DFS Thermo Scientific, температура испарителя 150–260°C, ионизация ЭУ (70 эВ).

Рентгеноструктурный анализ проводили на дифрактометре Bruker Каппа АРЕХ II с двухкоординатным CCD детектором (Мо К α -излучение, графитовый монохроматор, ω - ϕ сканирование в области 2 θ).

Воду деионизированную для хроматографического анализа получили на приборе Millipore.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование химического состава

С помощью общепринятых реакций в *Saposhnikovia divaricatae radices* обнаружены следующие классы биологически активных соединений: эфирные масла, жирные кислоты, тритерпеновые сапонины, флавоноиды, дубильные вещества.

Изучено количественное содержание липидной фракции (2.69–17.46%), водорастворимых полисахаридов (6.8–8.3%), пектиновых веществ (0.3–1.1%), гемицеллюлозы А (2.5–13.8%), гемицеллюлозы Б (1.8–14.3%), эфирных масел (в корнях менее 0.5%, в траве 0.5%), флавоноидов (в корнях от 0.29±0.006 до 0.48±0.02%, в траве от 1.97±0.06 до 3.22±0.06%), дубильных веществ (в корнях от 0.38±0.01 до 0.55±0.02%, в траве от 1.52±0.02 до 6.51±0.02%) и хромонов, таких как *перв-О*-глюкозилцимифугин (от 0.13±0.005 до 5.22±0.18 мг/г), цимифугин (от 0.01±0.004 до 1.82±0.06 мг/г) и 4'-*О*- β -D-глюкозил-5-*О*-метилвисамминол (от 0.98±0.04 до 3.25±0.14 мг/г).

Из водно-этанольного экстракта сапожниковии растопыренной корней флоры Бурятии и Монголии путем последовательной обработки петролейным эфиром, диэтиловым эфиром, *трет*-бутилметилловым эфиром и этилацетатом выделены индивидуальные хромоны и кумарины (рисунок 1). Наибольший выход суммы экстрактивных веществ наблюдался в этилацетатных вытяжках (0.89% и 1.46%). В петролейно-эфирной вытяжке выявлено наличие панаксинола (до 20%). Эфирная вытяжка образца флоры Республики Бурятия содержала кумарины: скополетин (7%), бергаптен (1.9%), изоимператорин (0.8%), мармезин (1.2%) и хромоны: гамаудол (6%) и цимифугин (8%). При хроматографировании эфирного извлечения образца

Монголии выделены индивидуальные хромоны: цимифугин (9%) и 5-О-метилвисамминол (1.8%). Дополнительно из обоих экстрактов выделили панаксинол (12% в образце Бурятии и 18% в образце Монголии). Из *трет*-бутилметиловой вытяжки образца Бурятии выделили линейные и ангулярные кумарины: мармезин (2.6%), (+)-декурсинол (1.8%), (-)-прерупторин В (3.4%) и хромоны: гамаудол (8%) и 5-О-метилвисамминол (15%). Колоночной хроматографией *трет*-бутилметилового экстракта образца Монголии также выделили линейные и ангулярные кумарины: (+)-декурсинол (8.2%), оксипеucedанин гидрат (2.1%), (-)-прерупторин В (5.6%) и хромоны цимифугин (12%), гамаудол (13%) и 5-О-метилвисамминол (15%). При хроматографии этилацетатного извлечения образца Бурятии помимо кумаринов (прерупторина В (1.8%), оксипеucedанин гидрата (2.8%), декурсинола (2.6%), хромонов – гамаудола (3%) и цимифугина (8%), выделили хромоновые гликозиды: *перв*-О-глюкозилцимифугин (5%), *втор*-О-глюкозилгамаудол (6%), 4'-О-β-D-глюкозил-5-О-метилвисамминол (7%) и 4'-О-β-D-глюкозилвисамминол (3%). Хроматографирование фракции позволило выделить дополнительно прерупторин В (2.2%), оксипеucedанин гидрат (3.2%), декурсинол (6.2%), гамаудол (4%) и цимифугин (7%) и хромоновые гликозиды: *перв*-О-глюкозилцимифугин (3%), *втор*-О-глюкозилгамаудол (2%), 4'-О-β-D-глюкозил-5-О-метилвисамминол (2%) и 4'-О-β-D-глюкозилвисамминол (6%).

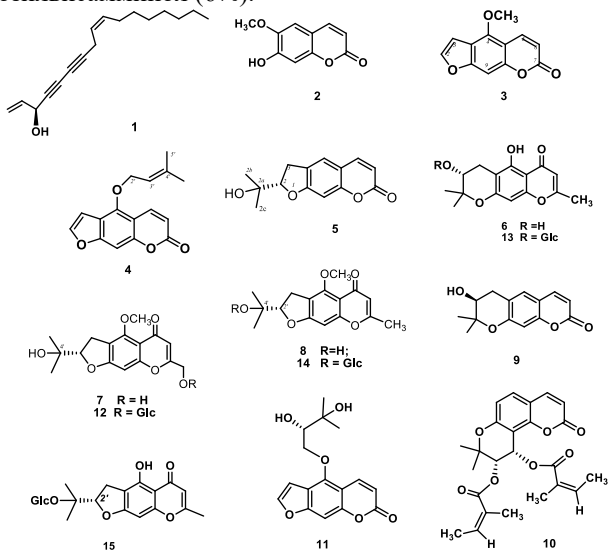


Рисунок 1. Структурные формулы соединений, выделенных из *Saposhnikovia divaricatae radices*

Методом РСА установлена структура выделенного (–)-прерупторина В (рисунок 2).

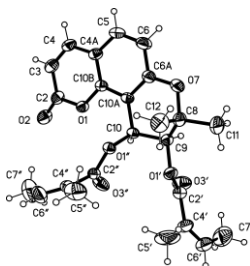


Рисунок 2. Молекулярная структура и нумерация атомов (–)-прерупторина В

Газо-хромато-масс-спектрометрическим методом изучен жирно-кислотный состав. Идентифицированы 18 жирных кислот, стерины и соединение полииновой природы (панаксинол до 35.50%). Установлено высокое содержание линолевой (34.53–48.49%), олеиновой (8.85–30.33%), пальмитиновой (6.15–18.30%) кислот.

Методом ГХ/МС исследован компонентный состав эфирного масла корней и травы *Saposhnikovia divaricata*. Эфирное масло из корней содержит β-бисаболен и панаксинол, в то время как в эфирном масле из травы идентифицировано до 73 соединений терпеновой и полиацетиленовой природы. Доминирующими компонентами последнего являются гермакрен Д (до 39.49%), Δ-кадинен (до 25.95%), спатуленол (до 13.17%), γ-мууролен (до 10.21%), кариофиллен (до 7.59%), γ-кадинен (до 6.92%), α-мууролен (до 6,64%), α-пинен (до 5.59%), α-кадинен (до 2.75%), α-копаен (до 2.20%).

Проведено исследование по накоплению 14 металлов, среди которых 2 относятся к тяжелым металлам (Pb, Cd).

Фармакогностическое изучение

Определены внешние признаки *цельного сырья*: корни имеют коническую форму. Поверхность неочищенных корней морщинистая, имеется коричневая волосистость, характеризуется продольной морщинистостью. Характер излома ровный с небольшой пористостью. Длину и диаметр корней определяли с помощью линейки и миллиметровой бумаги. Так корни достигают до 30 см в длину, а диаметр составляет 0.5 – 2 см. Цвет корней светло-коричневый. Запах специфический. *Измельченное сырье* представляет собой кусочки корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 7 мм. Цвет корней светло-коричневый. Запах специфический. *Порошок* – смесь кусочков корней различной формы, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 2 мм. Цвет корней светло-коричневый. Запах специфический.

В ходе микроскопического анализа корней получены следующие результаты. На поперечном срезе видно, что корни имеют вторичное

строение, виден радиальный закрытый сосудисто-волокнистый пучок, сердцевинные лучи, перидерма. Проводящая система представлена сосудами и трахеидами, имеющими лестничное утолщение вследствие срастания витков. Клетки эпидермиса коры имеют прямоугольную, вытянутую форму с прямыми стенками. Сердцевинные лучи образованы 2 – 3 слоями клеток. Наблюдается наличие четко видимых капель эфирного масла, окрашенных в ярко желтый и оранжевый цвета и многочисленные секреторные каналы, также окрашенные в ярко оранжевый и желтый цвета. При микроскопическом анализе порошка сапожниковии растопыренной корней видны фрагменты сосудов, клеток с эфирными маслами и крахмальными зернами (рисунок 3).

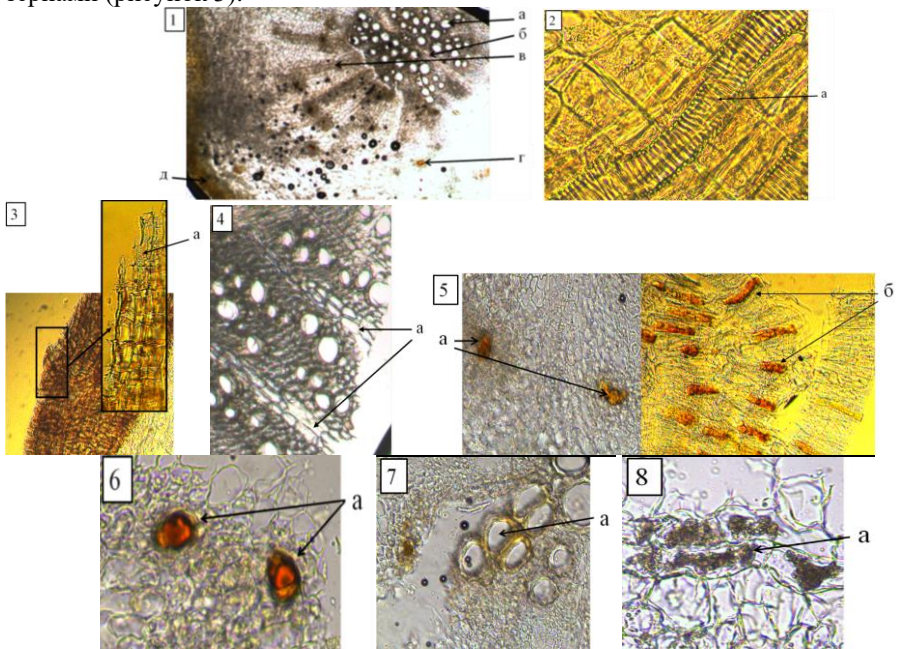


Рисунок 3. Микроскопия сапожниковии растопыренной корней: 1 – Поперечный срез корня: а – ксилема; б – флоэма; в – сердцевинные лучи; г – капли эфирного масла; д – перидерма; 2 – Продольный срез: а – проводящий сосуд; 3 – Поперечный срез корня: а – клетки эпидермиса коры; 4 – Поперечный срез корня: а – клетки сердцевинных лучей; 5 – Продольный срез корня: а – клетки с эфирными маслами, б – секреторные каналы; 6 – Фрагмент паренхимы: а – клетки с эфирными маслами; 7 – Фрагмент сосудов: а – ксилема; 8 – Фрагмент паренхимы: а – клетки с крахмальными зернами.

Для обнаружения хромонов нами рекомендуется реакция с раствором уранилацетата. При взаимодействии с 0.1 % водным раствором уранилацетата хромоны образуют окрашенный раствор оранжевого цвета. Методом тонкослойной хроматографии этилацетатного извлечения сапожниковии растопыренной корней с растворами свидетелей (*перв-О-глюкозилцимифугина*, *цимифугина*, *4'-О-β-D-глюкозил-5-О-метилвиссаминола*) проявляются желтые пятна, которые при облучении УФ-светом приобретают фиолетовую окраску.

Подобраны оптимальные условия экстракции по типу экстрагента, времени экстракции, соотношению сырья-экстрагент, кратности экстракции. При подборе метода экстракции получены извлечения методами мацерации, ускоренной мацерации при нагревании, экстракции при комнатной температуре с помощью магнитной мешалки и ультразвуковой экстракции (УЗ-экстракция). Выявлено, что при использовании метода УЗ-экстракции наблюдается наибольший выход хромонов (рисунок 4).

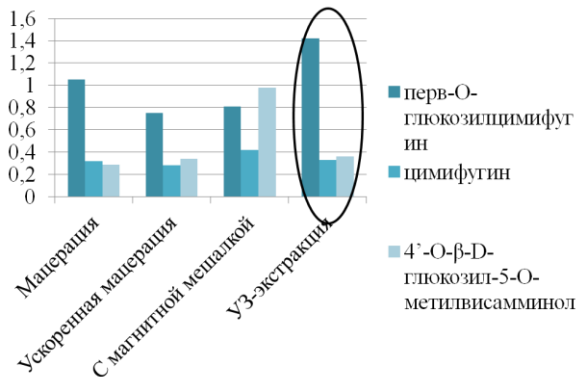


Рисунок 4. Выход хромонов в зависимости от метода экстракции

Выбор экстрагента основан на хорошей растворимости хромонов в спиртах. Наибольший выход *перв-О-глюкозилцимифугина*, *цимифугина* и *4'-О-β-D-глюкозил-5-О-метилвиссаминола* наблюдается при экстракции спиртом этиловым 50% и спиртом метиловым с такой же концентрацией. В качестве экстрагента хромонов выбран спирт этиловый ввиду меньшей токсичности по сравнению с метанолом (рисунок 5).

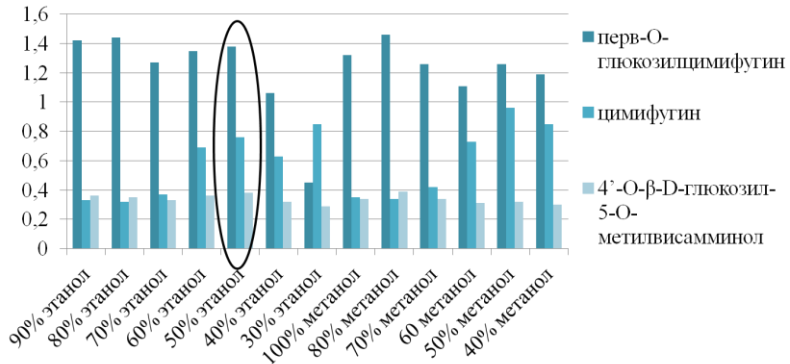


Рисунок 5. Выход хромонов в зависимости от типа экстрагента

Подобран параметр «соотношение сырьё-экстракт» и установлено его оптимальное значение для трех хромонов – 1:10 (рисунок 6).

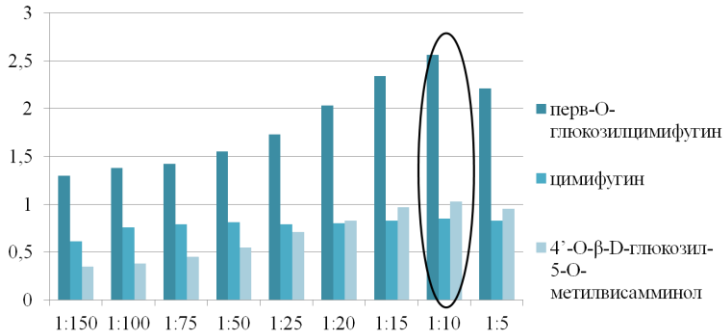


Рисунок 6. Выход хромонов в зависимости от соотношения сырьё-экстракт

При экстракции в течение 40 мин наблюдался наибольший выход хромонов. Лекарственное растительное сырьё экстрагируют трехкратно.

Представлена методика количественного определения хромонов в *Saposhnikovia divaricatae radices*: около 2.5 г (точная навеска) измельченного сырья с размером частиц не более 2 мм помещали в плоскодонную колбу объемом 100 мл, прибавили 25 мл этилового спирта 50% и экстрагировали методом ультразвуковой экстракции при частоте 22кГц при комнатной температуре в течение 40 минут. Извлечение фильтровали через фильтр «синяя лента» в мерную колбу вместимостью 50 мл. Остаток на фильтре переносили обратно в ту же колбу, прибавили 25 мл этилового спирта 50% и повторили экстракцию в тех же условиях. Полученное извлечение снова

фильтровали через тот же фильтр в ту же мерную колбу и доводили объем раствора до метки этиловым спиртом той же концентрации.

Для анализа количественного содержания хромонов выбран метод высокоэффективной жидкостной хроматографии. Валидирована аналитическая методика определения количественного содержания хромонов *Saposhnikovia divaricatae radices* по таким характеристикам как специфичность, линейность, правильность, сходимость и внутрилабораторная воспроизводимость (рисунок 7, 8).

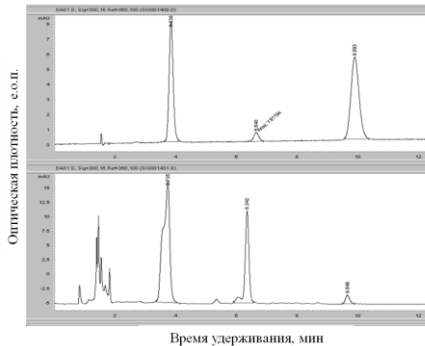


Рисунок 7. Хроматограммы стандартных растворов и этанольного извлечения

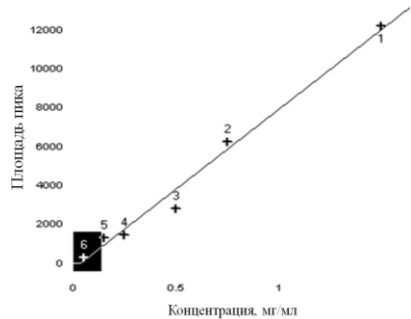


Рисунок 8. Калибровочный график стандартного образца *перв-О-глюкозилцимифугина* ($r=0.9937$)

Определены требования к числовым показателям *Saposhnikovia divaricatae radices*: содержание *перв-О-глюкозилцимифугина* не менее 2 мг/г, *цимифугина* не менее 0.05 мг/г, *4'-О-β-D-глюкозил-5-О-метилвисамминола* не менее 1.50 мг/г, суммы экстрактивных веществ не менее 30%, влажности не более 10%, золы общей не более 7%, золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте не более 0.5%, других частей этого растения не более 5%, почерневших на изломе не более 5%, органической примеси не более 5%, минеральной примеси не более 5%, частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 3 мм, % (для цельного сырья) не более 5%, частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 7 мм, % (для измельченного сырья) не более 5%, частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0.5 мм, % (для измельченного сырья) не более 5%, частиц, не проходящих сквозь сито с отверстиями размером 2 мм, % (для порошкообразного сырья) не более 5%, частиц, проходящих сквозь сито с отверстиями размером 0.18 мм, % (для порошкообразного сырья) не более 5%.

Разработка способа получения экстракта сухого

При подборе оптимальных условий экстракции хромонов из корней сапожниковии растопыренной было выявлено, что метод ультразвуковой экстракции позволяет получить максимальные количества данных веществ. В процессе разработки способа получения экстракта сухого подобраны растворитель, степень измельченности, соотношение сырье-экстрагент, время экстракции, кратность экстракции (таблица 1). Таким образом, сапожниковии растопыренной корней экстракт сухой получили двукратной экстракцией спиртом этиловым 50% и 60% по 40 минут при измельченности корней размером до 2 мм и соотношении сырье-экстрагент – 1:10. Полученные извлечения объединяли и упаривали до половинного объема по отношению к массе исходного сырья. Экстракт высушивали в вакуум-сушильном шкафу в течение 5 ч при 50°C. Выход составил 19% от массы взятой навески.

Таблица 1. Зависимость выхода экстрактивных веществ и хромонов от концентрации экстрагента, степени измельченности, соотношения сырье-экстрагент

Условия экстракции	Сумма экстрактивных веществ, %	Количественное содержание <i>перв</i> -О-глюкозилцимифугина, мг/г	Количественное содержание цимифугина, мг/г	Количественное содержание 4'-О-β-D-глюкозил-5-О-метилвисаммина, мг/г
Концентрация экстрагента				
Этиловый спирт 90%	27.27±1.26	2.13±0.07	0.09±0.004	0.86±0.02
Этиловый спирт 80%	30.03±0.91	2.31±0.04	0.09±0.003	0.89±0.01
Этиловый спирт 70%	33.16±1.51	2.41±0.02	0.10±0.004	0.95±0.08
Этиловый спирт 60%	34.03±0.99	2.55±0.05	0.11±0.005	0.99±0.01
Этиловый спирт 50%	36.77±1.54	2.64±0.09	0.13±0.006	1.03±0.02
Этиловый спирт 40%	37.04±1.48	2.55±0.04	0.12±0.005	0.97±0.04
Этиловый спирт 30%	35.64±1.30	2.45±0.004	0.10±0.003	0.94±0.03
Размер частиц, мм				
0.5	36.03±1.32	2.31±0.09	0.09±0.004	0.97±0.03
1.0	36.54±1.40	2.63±0.11	0.12±0.003	0.99±0.04
2.0	36.77±1.66	2.64±0.09	0.13±0.006	1.03±0.02
3.0	36.61±1.39	2.60±0.07	0.11±0.003	1.03±0.04
5.0	35.79±1.08	2.57±0.06	0.09±0.004	0.97±0.01
Соотношение сырье-экстрагент				
1:20	36.06±1.45	2.00±0.03	0.08±0.003	0.83±0.01
1:15	36.11±1.73	2.30±0.09	0.09±0.004	0.88±0.07
1:14	36.64±1.37	2.42±0.01	0.10±0.004	0.90±0.09

1:12	36.70±1.20	2.60±0.05	0.10±0.003	1.00±0.04
1:10	36.77±0.83	2.64±0.09	0.13±0.006	1.03±0.02
1:8	36.75±1.07	2.49±0.05	0.11±0.005	0.98±0.02

В *Saposhnikoviaie diaricatae radices extractum siccum* с помощью качественных реакций и ТСХ-хроматографии обнаружены хромоны. По разработанной и валидированной методике определено количественное содержание хромонов (рисунок 9).

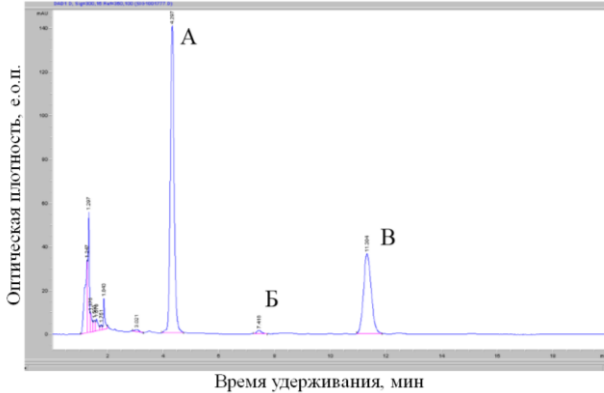


Рисунок 9. Хроматограмма *Saposhnikoviaie diaricatae radices extractum siccum*: пик А – *перв-О-глюкозилцимифугин*; пик Б – *цимифугин*; пик В – *4'-О-β-D-глюкозил-5-О-метилвисамминол*.

При анализе химического состава липидной фракции экстракта сухого из сапожниковии растопыренной корней, выявлено, что данная фракция содержит каприловую, пентадециловую, пальмитиновую, линолеовую и эруковую кислоты (рисунок 10). Сумма полиненасыщенных жирных кислот (74.18%) превышает сумму насыщенных жирных кислот (25.87%). Содержание линолевой кислоты составляет 54.73%.

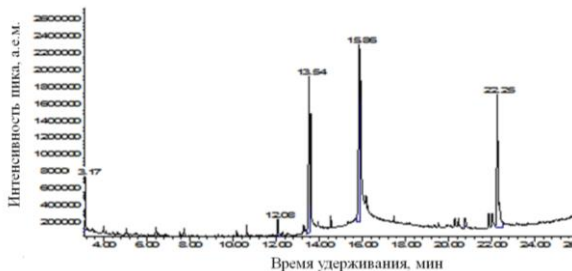


Рисунок 10. Хроматограмма липидной фракции сапожниковии растопыренной корней экстракта сухого

Разработаны числовые показатели для сапожниковии растопыренной корней экстракта сухого. Так по описанию *Saposhnikovia divaricatae radices extractum siccum* представляет собой коричневый порошок со специфическим запахом. Потеря в массе при высушивании составила 2.67-3.55% (не более 5%), количественное содержание *перв-О*-глюкозилцимифугина 11.85 мг/г (не менее 10 мг/г), цимифугин 0.65 мг/г (не менее 0.5 мг/г) и 4'-*О*-β-D-глюкозил-5-*О*-метилвисамминола 7.66 мг/г (не менее 6 мг/г). Срок хранения экстракта сухого из сапожниковии растопыренной корней 2 года.

Разработан проект фармакопейной статьи «Сапожниковии растопыренной корней экстракт сухой».

На моделях ишемии головного мозга при пероральном введении мышам сапожниковии растопыренной корней экстракт сухой проявляет нейротропную активность. В ходе исследований *in vitro* определена антирадикальная активность экстракта сухого.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Проведено исследование химического состава *Saposhnikovia divaricatae radices* флоры России (Республика Бурятия, Забайкальский край), Монголии, Китая. Установлено количественное содержание липидной фракции (2.69-17.46%), водорастворимых полисахаридов (6.8-8.3%), пектиновых веществ (0.3-1.1%), гемицеллюлозы А (2.5-13.8%), гемицеллюлозы Б (1.8-14.3%), эфирных масел в корнях (менее 0.5%) и в траве (0.5%), флавоноидов в корнях (от 0.29±0.006 до 0.48±0.02%) и в траве (от 1.97±0.06 до 3.22±0.06%), дубильных веществ в корнях (от 0.38±0.01 до 0.55±0.02%) и в траве (от 1.52±0.02 до 6.51±0.02%) и хромонов, таких, как *перв-О*-глюкозилцимифугин (от 0.13±0.005 до 5.22±0.18 мг/г), цимифугина (от 0.01±0.004 до 1.82±0.06 мг/г), 4'-*О*-β-D-глюкозил-5-*О*-метилвисамминола (от 0.98±0.04 до 3.25±0.14 мг/г). В липидной фракции идентифицированы 18 жирных кислот, стерины и соединения полииновой природы – панаксинол. Отмечается высокое содержание линолевой (34.53–48.49%), олеиновой (8.85–30.33%), пальмитиновой (6.15–18.30%) кислот. В ходе изучения компонентного состава эфирного масла выявлено содержание β-бисаболена и (Z)-фалькаринола. Проведено исследование по накоплению 14 металлов, среди которых 2 относятся к тяжелым металлам (Pb, Cd).

2. Для определения подлинности выявлены внешние признаки сырья: корни цилиндрической формы, слегка суживающиеся к концу, до 30 см длиной и 0.5-1.5 см диаметром, коричневого цвета со специфическим запахом. Установлены микроскопические признаки сырья: радиально закрытый сосудисто-волокнистый пучок, прямоугольной вытянутой формы с прямыми стенками клетки эпидермиса коры, капли эфирного масла, окрашенные в ярко желтый и оранжевый цвета и многочисленные секреторные каналы, также окрашенные в ярко оранжевый и желтый цвета.

3. Для разработки методики количественного содержания *перв*-О-глюкозилцимифугина, цимифугина и 4'-О-β-D-глюкозил-5-О-метилвисамминола в сырье подобраны оптимальные условия экстракции – двукратная ультразвуковая экстракция этиловым спиртом 50% в течение 40 минут. Аналитическая методика ВЭЖХ-анализа хромонов валидирована и соответствует критериям специфичности, линейности, правильности, сходимости, внутрилабораторной воспроизводимости.

4. Определены требования к показателям доброкачественности *Saposhnikoviae divaricatae radices*: содержание *перв*-О-глюкозилцимифугина не менее 2 мг/г, цимифугина не менее 0.05 мг/г, 4'-О-β-D-глюкозил-5-О-метилвисамминола не менее 1.50 мг/г, суммы экстрактивных веществ не менее 30%, влажности не более 10%, золы общей не более 7%, золы, нерастворимой в хлористоводородной кислоте не более 0.5%, примесей не более 5%. Разработан проект фармакопейной статьи «Сапожниковии растопыренной корни».

5. Разработан способ получения сапожниковии растопыренной корней экстракта сухого методом ультразвуковой экстракции при постадийной обработке 50% и 60% этанолом, в течение 40 минут на каждую стадию, при степени измельченности сырья не более 2 мм и соотношении сырье-экстрагент 1:10. Установлены показатели качества экстракта сухого по описанию, подлинности, влажности (не более 5%), содержанию *перв*-О-глюкозилцимифугина (не менее 10 мг/г), цимифугина (не менее 0.5 мг/г) и 4'-О-β-D-глюкозил-5-О-метилвисамминола (не менее 6 мг/г). Подготовлен проект фармакопейной статьи «Сапожниковии растопыренной корней экстракт сухой».

Благодарности

Автор выражает искреннюю благодарность зав. лабораторией химии природных систем БИП СО РАН, д.х.н., проф. Раднаевой Ларисе Доржиевне за всестороннюю поддержку и предоставленную возможность проведения научных исследований. Особую благодарность автор выражает зав. лабораторией медицинской химии НИОХ СО РАН д.х.н., проф. Шульц Эльвире Эдуардовне за научное руководство во время прохождения стажировки в рамках проекта РФФИ №17-33-50176.

Отдельную благодарность автор выражает научному руководителю – к.фарм.н. Тараскину Василию Владимировичу за руководство диссертационным исследованием, а также коллективам лаборатории химии природных систем БИП СО РАН и кафедры фармации Медицинского института БГУ за профессиональную поддержку.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Урбагарова, Б.М. *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk.: химический состав, перспективы использования и проблемы сохранения / Б.М. Урбагарова, В.В. Тараскин, Л.Д. Раднаева // Вестник Бурятского государственного университета. Биология. География. – Улан-Удэ, 2016. – Вып. 2 (3). – С. 100-104.
2. Тараскин, В.В. Исследование компонентного состава эфирных масел *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. и *Bupleurum scorzoniferolium* Willd. / В.В. Тараскин, Ж.А. Тыхеев, Б.М. Урбагарова, Л.Д. Раднаева // Научное обозрение. – Вып. 5. – 2016. – С. 134-142.
3. Urbagarova, B.M. Biologically active compounds from the lipid fraction of *Saposhnikovia divaricata* / B.M. Urbagarova, V.V. Taraskin, E.E. Shul'ts, L.D. Radnaeva, O.A. Anenkhonov, Zh. Ganbaatar, N.B. Boldanova // Chemistry of Natural Compounds. – V. 53 (1). – 2017. – P. 138-140.
4. Тараскин, В.В. Растения флоры Бурятии и Монголии: химический состав, биологическая активность и перспективы использования / В.В. Тараскин, Ж.А. Тыхеев, Б.М. Урбагарова, Л.Д. Раднаева // Материалы XII международной научной конференции «Окружающая среда и устойчивое развитие Монгольского плато и сопредельных территорий». – Улан-Удэ, 2017. – С. 110-112.
5. Urbagarova, B.M. Composition of the lipid fraction of *Saposhnikovia divaricata* / B.M. Urbagarova, V.V. Taraskin, L.D. Radnaeva // Proceedings of 12th International Symposium on the Chemistry of Natural Compounds. – Tashkent, 2017. – P. 96.
6. Урбагарова, Б.М. Исследование количественного содержания хромонов *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischkin / Б.М. Урбагарова, В.В. Тараскин, Л.Д. Раднаева // Материалы третьей Всероссийской молодежной научной конференции с международным участием «Экологобезопасные и ресурсосберегающие технологии и материалы». – Улан-Удэ, 2017. – С. 288-289.
7. Урбагарова, Б.М. Микроскопический анализ сапожниковии растопыренной корней и травы / Б.М. Урбагарова, Л.Д. Раднаева, В.В. Тараскин, И.Р. Балданова // Здоровье и образование. – Вып. 20 (2). – 2018. – С. 117-121.
8. Урбагарова, Б.М. Элементный состав сапожниковии растопыренной / Б.М. Урбагарова // Сборник статей Международной научно-практической конференции молодых ученых «Наука и технологии: Байкал-2018». – Иркутск, 2018. – С. 283-286.
9. Тараскин, В.В. Исследование вторичных метаболитов растений семейства Umbelliferae (Ариасеae) для создания нейропротекторных агентов / В.В. Тараскин, Э.Э. Шульц, С.М. Гуляев, Б.М. Урбагарова, Ж.А. Тыхеев, Л.Д. Раднаева // Сборник тезисов XI Всероссийской научной конференции с

международным участием и школы молодых ученых «Химия и технология растительных веществ». – Сыктывкар, 2019. – С. 216.

10. Урбагарова, Б.М. Компонентный состав эфирного масла сапожниковии растопыренной травы в зависимости от фазы развития / Б.М. Урбагарова, В.В. Тараскин, Л.Д. Раднаева // Сборник тезисов XI Всероссийской научной конференции с международным участием и школы молодых ученых «Химия и технология растительных веществ». – Сыктывкар, 2019. – С. 234.

11. Urbagarova, B.M. Cultivation of *Saposhnikovia divaricata* (Turcz). Schisckin / B.M. Urbagarova, V.V. Taraskin, L.D. Radnaeva // Abstracts of International conference «Research-innovation 2019». – Ulaanbaator, 2019. – P. 12.

12. Urbagarova, B.M. Development of assay method by HPLC-DAD for the quantitative determination of chromones in *Saposhnikovia divaricata radices* and its validation / B.M. Urbagarova, V.V. Taraskin, E.E. Shul'ts, L.D. Radnaeva // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. – 2019. – V. 320 (1). doi:10.1088/1755-1315/320/1/012056

Подписано в печать 08.10.2019 г. Формат 60x84 1/16.
Бумага офсетная. Объем 1,4 печ.л. Тираж 100. Заказ №

Отпечатано в типографии Изд-ва Федерального государственного
бюджетного учреждения науки БНЦ СО РАН
670047 г Улан-Удэ ул. Сахьяновой, 6