

Кривошеев Игорь Михайлович

ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СПИРЕИ
ИВОЛИСТНОЙ (*Spiraea salicifolia* L.), ПРОИЗРАСТАЮЩЕЙ В
ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ

14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Улан-Удэ – 2014

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

Научный руководитель:

Мирович Вера Михайловна – доктор фармацевтических наук.

Официальные оппоненты:

Намзалов Бимба-Цырен Батомункуевич – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Бурятский государственный университет» Министерства образования и науки РФ / кафедра ботаники, заведующий.

Федосеева Людмила Михайловна – доктор фармацевтических наук, профессор, Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ / кафедра фармацевтической химии с курсом органической и токсикологической химии, заведующий.

Ведущая организация – Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ.

Защита состоится «29» мая 2014 г. в 15⁰⁰ часов на заседании Диссертационного совета ДМ 003.028.02 при Институте 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.

Автореферат разослан « » апреля 2014 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук, доцент



В.Б. Хобракова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. В последние годы во всем мире остается высоким интерес к лекарственным препаратам, созданным на основе природного сырья. Лекарственные растения содержат биологически активные вещества (БАВ), которые обладают широким спектром терапевтического действия, малотоксичны и характеризуются стабильным фармакологическим эффектом.

В терапии большинства заболеваний используются синтетические лекарственные средства (Государственный реестр лекарственных средств, 2012). Однако, при выраженном терапевтическом эффекте, они имеют побочные действия, противопоказания и ограничения к применению, не всегда предотвращают развитие рецидива после отмены препарата (Ивашкин В.Т., Лапина Т.Л., 2008). Для профилактики заболеваний, при их хроническом течении рекомендуется использование в комплексной терапии лекарственных растительных средств (Соколов С.Я., 2000).

Новыми источниками растительных средств могут быть представители рода спирея – *Spiraea* L. На территории СНГ произрастает 22 вида рода *Spiraea*, в Восточной Сибири встречается 13 видов (Черепанов С.К., 1995).

Растения рода *Spiraea* содержат фенольные соединения (катехины, танины, флавоноиды, фенолкарбоновые кислоты, кумарины), тритерпеноиды, эфирные масла и др. (Карпова Е.А., 2011; Костикова В.А., 2012; Mughal U. et al., 2012). Для отдельных видов рода *Spiraea*, произрастающих в Юго-Восточной Азии характерно накопление дитерпеновых алкалоидов атизинового и гетизинового типа (Горбунов В.Д. с соавт., 1976; Li L. et al., 2002).

В Восточной Сибири наибольшее распространение имеет спирея иволистная (*Spiraea salicifolia* L.) В народной медицине настои листьев, отвары коры и корней этого растения используют при желудочно-кишечных, гинекологических заболеваниях, как мочегонное, а также при респираторных заболеваниях, ревматизме и гельминтозах. В монгольской медицине настоем листьев *S. salicifolia* применяют при укусах змей (Растительные ресурсы СССР, 1991).

Сведения по применению *S. salicifolia* в народной медицине, достаточные сырьевые ресурсы на территории Восточной Сибири определяют перспективность изучения этого растения для внедрения в медицинскую практику. В связи с этим проведение комплексного фармакогностического исследования *S. salicifolia* является актуальным.

Цель и задачи исследования. Целью настоящего исследования явилось фитохимическое изучение *Spiraea salicifolia* L., произрастающей в Восточной Сибири, получение экстракта сухого, установление показателей качества сырья и экстракта сухого.

Для достижения указанной цели необходимо было решить следующие **задачи**:

1. Изучить состав фенольных соединений, полисахаридов, терпеноидов, аминокислот, микроэлементов, жирных кислот *S. salicifolia*.
2. Провести количественное определение основных групп соединений. Изучить закономерности распределения и накопления некоторых групп соединений по органам и фазам развития, обосновать рациональные сроки заготовки сырья.
3. Установить макро- и микроскопические признаки *S. salicifolia* и близких видов рода *Spiraea*, произрастающих в Восточной Сибири.
4. Провести исследования по установлению норм качества сырья *S. salicifolia* для включения в проект нормативной документации (ФСП).
5. Разработать технологию получения экстракта сухого и методов его стандартизации.

Научная новизна. В результате химического исследования в побегах *S. salicifolia*, произрастающей в Восточной Сибири, было идентифицировано более 20 соединений, в т.ч. впервые для вида спиреозид (кверцетин-4'-*O*-глюкозид), феруловая, 3-*O*-, 4-*O*-кофеилхинные кислоты и 1-*O*-кофеил-глюкоза, дигидрокверцетин, (+)-катехин, (-)-эпигаллокатехин, (-)-эпикатехин, проциандин В1 и цианидин. Методом хромато-масс-спектрометрии и ТСХ в надземных органах *S. salicifolia* впервые идентифицированы терпеноиды: вербенон, *E*-оцименон, гексагидрофарнезиллацетон, изопулегол, лонгипинан, дегидроабьетиновая кислота и ее метиловый эфир, глицирризиновая, урсоловая и олеаноловая кислоты. Показано, что для цветков *S. salicifolia* характерно накопление 3-*O*-кофеилхинной кислоты, астрагалина и гиперозида; для листьев – кофеил-1-*O*-глюкозида, рутин и изокверцитрина; для стеблей – изокверцитрина, 1-*O*-кофеил-глюкоза и 3-*O*-кофеилхинной кислоты. Изучены полисахаридные компоненты *S. salicifolia*, в т.ч. водорастворимые полисахариды, пектиновые вещества, гемицеллюлозы А и Б. Установлено, что в их состав входят арабиноза, рамноза, глюкоза, галактоза, ксилоза и галактуроновая кислота. Исследование аминокислотного состава показало, что для листьев *S. salicifolia* характерно накопление γ -аминомасляной кислоты, цистеина и цитруллина; для цветков – аспарагина, аланина и глутаминовой кислоты. Установлено содержание в надземных органах *S. salicifolia* 9 макро-, 54 микро- и ультрамикроэлементов. Определены микродиагностические признаки *S. salicifolia* и 6 видов рода *Spiraea*, произрастающих в Восточной Сибири.

Практическая значимость. Разработаны спектрофотометрические методики количественного определения суммарного содержания флавоноидов (в пересчете рутин) и фенолкарбоновых кислот (в пересчете на кофейную кислоту) в сырье и экстракте сухом. Установлено, что максимальное накопление флавоноидов, фенолкарбоновых кислот и дубильных веществ характерно для надземных органов *S. salicifolia* текущего года жизни в период цветения. Предложен новый вид лекарственного растительного сырья «Спиреи иволистной побеги – *Spiraeae salicifoliae* cogmus», на который разработаны проект ФСП, Инструкция по сбору и сушке. Разработан способ получения экстракта сухого, обладающего

противовоспалительной, мочегонной и антиоксидантной активностью. На технологию экстракта сухого получено положительное решение по заявке на выдачу Патента РФ (заявка № 2013150048/15 (077894)).

Степень внедрения. Материалы диссертации вошли в методическое пособие «Растения рода Спирея – *Spiraea* L. флоры Центральной Сибири (географическое распространение, морфология, микроскопия)» (Иркутск, 2013.–27 с.), которое внедрено в учебный процесс на кафедре фармакогнозии и ботаники ГБОУ ВПО ИГМУ Минздрава России. Результаты диссертационной работы используются в учебном процессе на кафедре фармацевтической и токсикологической химии, на факультете повышения квалификации провизоров ИГМУ. Результаты исследований по стандартизации сырья *S. salicifolia* внедрены в работу аналитической лаборатории ООО «Шалфей» (г. Иркутск).

На защиту выносятся:

- результаты фитохимического исследования надземных органов *S. salicifolia*, исследования по изучению закономерностей накопления БАВ в зависимости от некоторых экологических факторов;
- результаты макро- и микроскопического исследования *S. salicifolia* и некоторых представителей рода *Spiraea*, произрастающих в Восточной Сибири;
- результаты исследований по стандартизации сырья *S. salicifolia*;
- результаты по разработке технологии и показателей качества экстракта сухого.

Личное участие автора. Автором проведен анализ сведений литературы по теме диссертационной работы, выполнены экспериментальные исследования, обработаны и проанализированы полученные результаты. Фрагменты работы по изучению состава фенольных соединений методом микроколоночной ВЭЖХ проведены совместно с д.ф.н. Оленниковым Д.Н. – старшим научным сотрудником ФГБУН «Института общей и экспериментальной биологии СО РАН». Соискателем подготовлены доклады, тезисы, статьи, оформлена диссертация и автореферат.

Апробация полученных результатов. Основные положения и результаты работы доложены и обсуждены на: межрегиональной конференции по фармации и фармакологии «Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции» (Пятигорск, 2011, 2012, 2013); международной конференции «Renewable Wood and Plant Resource – Возобновляемые лесные и растительные ресурсы: химия, технология, фармакология, медицина» (Санкт-Петербург, 2011); региональной конференции «Актуальные вопросы охраны населения регионов Сибири» (Красноярск, 2011); Всероссийской Байкальской научно-практической конференции молодых ученых и студентов с международным участием «Актуальные вопросы современной медицины» (Иркутск, 2011, 2012, 2013); I Всероссийской заочной научно-практической конференции «Новые технологии в промышленности и сельском хозяйстве» (Бийск, 2012); «VII международной конференции молодых ученых медиков» (Курск, 2013).

Связь задач исследования с проблемным планом. Диссертационная работа выполнена в соответствии с планом основных научно-исследовательских работ ГБОУ ВПО «Иркутский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по комплексной теме «Изучение перспективных лекарственных растений Восточной Сибири» (номер государственной регистрации 01.2.00304320).

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 14 научных работ, в том числе 5 статей - в периодических изданиях, рекомендованных ВАК МОиН РФ.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 162 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания объектов и методов исследований, четырех глав, отражающих результаты собственных экспериментальных исследований, выводов и приложения. Работа иллюстрирована 46 таблицами и 32 рисунками. Библиографический указатель включает 186 источников, из них 31 - на иностранных языках.

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 рода *Spiraea* и вида *S. salicifolia*, ботаническое описание, данные по химическому составу и использованию растений рода *Spiraea* в народной медицине.

Вторая глава посвящена описанию объектов и методов исследований.

В третьей главе отражены результаты фитохимического исследования надземных органов *S. salicifolia*. Приведены данные по изучению динамики накопления основных БАВ по органам растения, фазам вегетации, в зависимости от места сбора.

В четвертой главе приведены данные по макро- и микроскопическому изучению *S. salicifolia* и других видов рода *Spiraea*.

В пятой главе изложены материалы по товароведческому анализу сырья *S. salicifolia*, 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, данные по изучению его химического состава и стандартизации.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследований

Объектом исследований являлись надземные органы спиреи иволистной – *Spiraea salicifolia* L., собранные в 2009-2013 гг. в Иркутской области и республике Бурятия. Для проведения сравнительного микроскопического исследования видов рода *Spiraea* использовали образцы сырья собственного сбора, а также представленные ФГБУН «Институт

физиологии и биохимии растений» СО РАН (с. средняя – *S. media* Franz Schmidt, с. извилистая – *S. flexuosa* Fischer ex Cambess, с. пушистая – *S. pubescens* Turcz., с. даурская – *S. dahurica* (Rupr.) Maxim., с. альпийская – *S. alpine* Pallas, с. водосборolistная – *S. aquilegifolia* Pallas.).

Макроскопические признаки изучали по методике ГФ XI, вып. 1, с. 252. Микроскопические исследования проводили согласно ГФ XI, вып. 1, с. 277 с использованием микроскопов МБС-9, Микмед-1. Фотографировали микропрепараты на микроскопе Zeiss Axio starplus с последующей обработкой фотографий в программе Windows Adobe Photoshop 7,0.

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 Silufol UV-254, Sorbfil ПТСХ П-А-УФ-254.

Спектральные исследования проводили на спектрофотометре Specord S-100 (Analytik Zeiss Jena) и СФ-46 (ЛОМО) в кварцевых кюветах с толщиной поглощающего слоя 1 см.

Исследование компонентного состава фенольных соединений проводили методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Gilston (колонка 250×4,6 мм Kromasil C18, размер частиц 5 мкм; подвижная фаза метанол-вода-кислота фосфорная концентрированная (400:600:5). Количественный анализ осуществляли методом микроколоночной ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Милихром А-02 (Эконова); колонка ProntoSIL-120-5-C18 AQ (2 × 75 мм, Ø 5 мкм; Metrohm AG); подвижная фаза: 0.2 М LiClO₄ в 0.003 М HClO₄ (А), MeCN (В); градиентный режим (% В): линейный градиент 0–20 мин 5–100%; v 200 мкл/мин; температура колонки 35°C; λ 330, 360 нм

Компонентный состав терпеноидов исследовали на хромато-масс-спектрометре 6890N с квадрупольным масс-спектрометром 5973MSD в качестве детектора, на кварцевой колонке HP-5MS (Agilent Technologies; 30 м×250 мкм×0,25 мкм; неподвижная фаза 5%-фенил-95%-диметилполисилоксан). Идентификацию соединений проводили путем сравнения полных масс-спектров и времен удерживания с соответствующими данными чистых соединений и по данным масс-спектральной библиотеки NIST 02/MS.

Качественный и количественный состав аминокислот исследовали с помощью аминокислотного анализатора ААА-3.

Изучение элементного состава образцов проводили на квадрупольном масс-спектрометре Agilent 7500 се с использованием инертной системы ввода образца.

Золу общую и золу, нерастворимую в 10% растворе кислоты хлористоводородной, определяли на приборе ММ Мелистон.

Использованы статистические методы обработки результатов химического эксперимента (ГФ XI).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
Фитохимическое изучение *S. salicifolia*, произрастающей в
Восточной Сибири

Согласно данным качественных аналитических реакций и хроматографического исследования в надземных органах *S. salicifolia* установлено присутствие флавоноидов, фенолкарбоновых кислот, кумаринов, дубильных веществ, полисахаридов, аскорбиновой кислоты, сапонинов, эфирного масла.

Фенольные соединения. Выделение флавоноидов и фенолкарбоновых кислот из побегов *S. salicifolia* проводили методом колоночной хроматографии на полиамидном сорбенте. Предварительно в части спиртового извлечения был проведен гидролиз флавоноидов 1% кислотой хлористоводородной. В результате установили, что кверцетин и кемпферол являются основными флавоноидными агликонами *S. salicifolia* (табл. 1).

Таблица 1. Основные свойства флавоноидов и фенилпропаноидов, выделенных из *S. salicifolia*

Соединение	Формула	Т. пл., °С	УФ-спектр (EtOH), нм
<i>Соединения, выделенные из спиртового извлечения после кислотного гидролиза</i>			
Кверцетин (1)	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	316-318	372, 300п, 255, 274п
Кемпферол (2)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	269-272	367, 266
<i>Соединения, выделенные из спиртового извлечения</i>			
Кверцетин (1)	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	316-318	372, 300п, 255, 274п
Кемпферол (2)	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	269-272	367, 266
Гиперозид (3)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	236-237	362, 257, 269п
Изокверцитрин (4)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	225-227	359, 266п, 259
Авикулярин (5)	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	180-182	360, 274п, 262
Спиреозид (6)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	183-185	366, 266 п, 255
Астрагалин (7)	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	178-180	350, 300п, 267
Рутин (8)	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	195-198	360, 300п, 259, 266п
Кофейная кислота (9)	C ₉ H ₈ O ₄	196-198	328, 300п, 242
3-О-Кофеилхинная кислота (10)	C ₉ H ₈ O ₄	203-204	326, 300п, 245
4-О-Кофеилхинная кислота (11)	C ₉ H ₈ O ₄	200-201	326, 300п, 245
1-О-Кофеил-глюкоза (12)	C ₁₅ H ₁₈ O ₉	210-212	330, 299п, 240

Из нативных соединений было выделено 12 соединений, идентифицированных как флавоноиды – кверцетин (1), кемпферол (2), гиперозид (кверцетин-3-О-галактозид, 3), изокверцитрин (кверцетин-3-О-рамнозид, 4), авикулярин (кверцетин-3-О-арабинозид, 5), спиреозид (кверцетин-4'-О-глюкозид) 6), астрагалин (кемпферол-3-О-глюкозид, 7), рутин (кверцетин-3-О-рутинозид, 8); фенилпропаноиды – кофейная (9), 3-О- (10) и 4-О-кофеилхинная кислоты (11), 1-О-кофеил-глюкоза (12) (табл. 1). Ранее в *S. salicifolia* были обнаружены 1-5, 7-9; присутствие 6, 10-12 выявлено для данного вида впервые.

Присутствие всех выделенных флавоноидных гликозидов и фенолпропаноидов в побегах *S. salicifolia* подтверждается данными микроколоночной ВЭЖХ (рис. 1). Рутин (8.57 мг/г), изокверцитрин (7.30 мг/г) и гиперозид (6.12 мг/г) являются доминирующими флавоноидами, а 1-*O*-кофеил-глюкоза (25.16 мг/г) и 3-*O*-кофеилхинная кислота (8.15 мг/г) – доминирующими фенолпропаноидами (табл. 2).

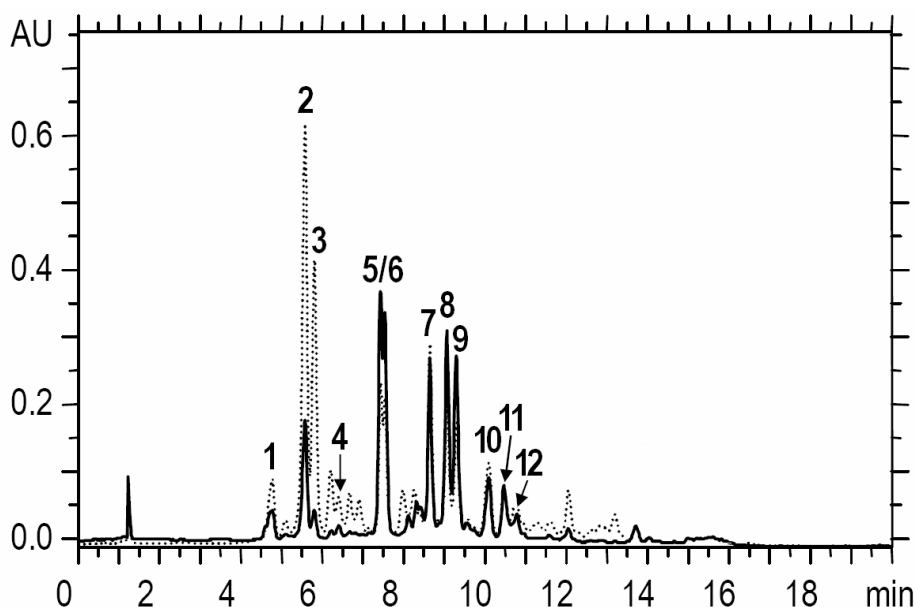


Рис. 1. Хроматограмма спиртового извлечения цветущих побегов *S. salicifolia*. Числами указаны соединения: **1** – 4-*O*-кофеилхинная кислота, **2** – 1-*O*-кофеил-глюкоза, **3** – 3-*O*-кофеилхинная кислота, **4** – кофейная кислота, **5/6** – неидентифицированные соединения, **7** – рутин, **8** – изокверцитрин, **9** – гиперозид, **10** – авикулярин, **11** – астрагалин, **12** – спиреозид. Детектор: 330 нм (пунктир), 360 нм (линия)

С применением ВЭЖХ на длинных колонках в *S. salicifolia* были дополнительно идентифицированы лютеолин-7-глюкозид, дигидрокверцетин, лютеолин, галловая кислота, феруловая кислота и эпикатехин.

Катехины и процианидины. С применением ТСХ в побегах *S. salicifolia* было идентифицировано присутствие катехинов, в т.ч. (+)-катехина и (-)-эпигаллокатехина. Положительные результаты реакции Потер указывают на присутствие в *S. salicifolia* процианидинов, один из которых на основании хроматографической подвижности был идентифицирован как процианидин В1.

Антоцианы. Учитывая пигментацию соцветий *S. salicifolia*, для данного вида характерно наличие антоцианов. После кислотного гидролиза суммы антоцианов хроматографическим методом (ТСХ) было установлено присутствие цианидина.

Кумарины. При исследовании хлороформного извлечения методом ТСХ в ПФ н-гексан-бензол-этанол (5:4:1) идентифицирован кумарин.

Таблица 2. Содержание фенольных соединений в побегах и надземных органах *S. salicifolia*, мг/г

Соединение	Побеги	Цветки	Листья	Стебли
Кофейная кислота	1,25	1,34	1,51	1,09
3- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота	8,15	13,42	7,14	2,14
4- <i>O</i> -Кофеилхинная кислота	0,63	1,93	0,25	1,00
1- <i>O</i> -Кофеил-глюкоза	25,16	4,82	38,46	2,25
Кверцетин	сл.	сл.	сл.	0,08
Гиперозид	6,12	8,01	4,56	1,22
Изокверцитрин	7,30	7,43	7,55	2,80
Авикулярин	1,33	3,39	2,00	0,19
Спиреозид	0,52	1,91	1,07	0,17
Астрагалин	2,09	11,70	1,08	0,44
Рутин	8,57	3,62	11,14	0,16
Идентифицировано, в т.ч.	61,12	57,57	74,96	11,54
Фенилпропаноиды	35,19	21,51	47,36	6,48
Флавоноиды	25,93	36,06	27,60	5,06
агликоны	сл.	сл.	сл.	0,08
гликозиды	25,93	36,06	27,60	4,98
моногликозиды	17,36	32,44	16,26	4,82
биозиды	8,57	3,62	11,14	0,16

Терпеноиды. Изучение состава терпеноидов проводили в листьях и цветках *S. salicifolia* методом хромато-масс-спектрометрии. Из монотерпенов в листьях найдены *E*-оцименон, изопулегол, в цветках обнаружен вербенон. Три соединения отнесены к сесквитерпенам: цветки накапливают фарнезан и гексагидрофарнезилацетон, а листья – лонгипинан. Данные соединения образуются в паренхимных клетках и растворены в клеточном соке, что подтверждается реакцией с суданом III (наблюдается окрашивание отдельных клеток паренхимы в оранжево-красный цвет).

Дитерпеноиды представлены дегидроабиетиновой кислотой, которая содержится в листьях и цветках *S. salicifolia*. Листья накапливают метиловый эфир дегидроабиетиновой кислоты (метилдегидроабиетат). Из тритерпеновых соединений в цветках была идентифицирована в следовых количествах глицирризиновая кислота (0,06% от суммы идентифицированных компонентов).

Идентифицированные моно- и сесквитерпеновые соединения, производные абиетиновой кислоты, глицирризиновая кислота обладают противовоспалительным действием (Толстикова Г.А. с соавт., 1997). Терпеноиды, содержащиеся в надземных органах *S. salicifolia*, вероятно, вносят вклад в проявление противовоспалительного эффекта.

Урсоловая и олеаноловая кислоты. В хлороформных извлечениях методом ТСХ (ПФ: хлороформ) после проявления 10% раствором фосфорномолибденовой кислоты обнаруживаются 4 пятна. Зоны с $R_f \sim 0,20$ и $\sim 0,30$ идентифицированы со свидетелями как олеаноловая и урсоловая кислоты, соответственно.

Кислота аскорбиновая. Обнаружение проводили в водных извлечениях методом ТСХ в ПФ этилацетат-кислота уксусная (80:20), детектирование осуществляли в УФ-свете до и после проявления 0,04% раствором 2,6-дихлорфенолиндофенолятом натрия. Наблюдали зону аскорбиновой кислоты с $R_f \sim 0,60$ белого цвета на розовом фоне.

Углеводы. Для выделения углеводов применяли отдельное фракционирование с использованием воды очищенной, смеси 0,5% растворов аммония оксалата и кислоты щавелевой и 7,5% раствора калия гидроксида. В результате были выделены фракции: ВРПС (водорастворимые полисахариды) – 2,94%, ПВ (пектиновые вещества) – 5,04%, ГцА (гемицелюлозы А) – 14,60%, ГцБ (гемицелюлозы Б) – 3,80%. Для исследования состава выделенных полисахаридов проводили кислотный гидролиз 2 М H_2SO_4 . Идентификацию продуктов гидролиза проводили БХ в системах н-бутанол-кислота уксусная-вода (4:1:2). В состав полисахаридных комплексов входят нейтральные моносахариды [арабиноза (Ara), рамноза (Rha), глюкоза (Glc), галактоза (Gal), ксилоза (Xyl)], а также уроновые кислоты (галактуроновая кислота, GalA). Свободные углеводы представлены моносахаридами и дисахаридом сахарозой (Sac) (табл. 3).

Таблица 3. Характеристика углеводных компонентов надземных органов *S. salicifolia*

Группа углеводов	Содержание, %	Моносахаридный состав
ВРПС	2,94	Ara, Rha, Glc, Gal, GalA
ПВ	5,04	Xyl, Ara, Glc, Gal, GalA
Гц А	14,60	Xyl, Glc, Gal
Гц Б	3,80	Xyl, Glc, Gal
Свободные углеводы	-	Rha, Glc, Gal, Sac

Высшие жирные кислоты и углеводороды. В силилированных пробах из побегов *S. salicifolia* было идентифицировано 8 высших жирных кислот, в т.ч. пальмитиновая, стеариновая, линолевая, линоленовая, арахидовая, бегеновая, трикозановая, лигноцериновая. В составе углеводородов было идентифицировано 8 соединений: гексилгептадекан, октадекан, пентакозан, эйкозан, генейкозан, докозан, трикозан, тетракозан.

Аминокислоты. В листьях *S. salicifolia* содержится 19 аминокислот, из них 8 незаменимых (валин, изолейцин, лейцин, треонин, лизин, фенилаланин, аргинин, гистидин), а в цветках – 18 аминокислот, из которых 7 незаменимых (изолейцин, лейцин, треонин, лизин, фенилаланин, аргинин, гистидин).

Элементный состав. В листьях и цветках *S. salicifolia* обнаружено 9 макро-, 54 микро- и ультрамикроэлемента. Из макроэлементов отмечается высокое содержание калия, кальция, магния, фосфора; из микроэлементов – марганца, цинка, меди. Цветки накапливают железа и меди больше, чем листья. По содержанию токсичных элементов исследуемые образцы листьев и цветков *S. salicifolia* соответствуют ПДК, указанным в СанПиН 2.3.2.1078-01 от 2001 года.

Количественное определение БАВ в надземных органах S. salicifolia. Количественный анализ побегов *S. salicifolia* показал, что доминирующей группой соединений данного вида сырья являются фенольные соединения, в т.ч. танины, флавоноиды, фенилпропаноиды, катехины, процианидины и антоцианы, суммарное содержание которых составляет около 14.5% (табл. 4).

Таблица 4. Химический состав побегов *S. salicifolia*

Группа соединений	Метод	Содержание, %
Органические кислоты (в пересчете на яблочную кислоту)	Титриметрический (ГФ XI)	2,68±0,10
Аскорбиновая кислота	Титриметрический (ГФ XI)	0,041±0,001
Тритерпеновые сапонины (в пересчете на урсоловую кислоту)	Спектрофотометрический	3,28±0,13
Дубильные вещества (в пересчете на танин)	Перманганатометрический (ГФ XI)	6,98±0,19
	Спектрофотометрический	4,57±0,08
Флавоноиды (в пересчете на рутин)	Спектрофотометрический	3,54±0,07
Фенолкарбоновые кислоты (в пересчете на кофейную кислоту)	Спектрофотометрический	4,31±0,14
Катехины (в пересчете на (+)-катехин)	Спектрофотометрический	0,73±0,02
Процианидины (в пересчете на цианидин)	Спектрофотометрический	1,22±0,04
Антоцианы (в пересчете на цианидин-3-О-глюкозид)*	Спектрофотометрический	0,192±0,007

* определено для цветков.

Количественное содержание дубильных веществ определяли перманганатометрическим и спектрофотометрическим методом. Максимум спектра поглощения водного извлечения из побегов *S. salicifolia* находится при 277 нм и близок к таковому таннина, который использовали в качестве РСО. Как показали исследования, спектрофотометрический метод обладает большей избирательностью и точностью, поэтому он был использован для анализа *S. salicifolia*.

Установлено, что наибольшее содержание дубильных веществ отмечается в листьях и цветках *S. salicifolia*. Стебли одревесневшие накапливают дубильных веществ несколько больше (2,38%), чем стебли текущего года жизни (2,02%) (рис. 2).

Наибольшее количество флавоноидов и фенолкарбоновых кислот накапливается в листьях и цветках *S. salicifolia*. Стебли текущего года (неодревесневшие) накапливают больше флавоноидов и фенолкарбоновых кислот, чем стебли одревесневшие (второго и третьего года жизни).

Согласно данным ВЭЖХ, доминирующими фенольными соединениями цветков *S. salicifolia* являются 3-*O*-кофеилхинная кислота (13.42 мг/г), астрагалин (11.70 мг/г) и гиперозид (8.01 мг/г); в листьях преобладают 1-*O*-кофеил-глюкоза (38.46 мг/г), рутин (11.14 мг/г) и изокверцитрин (7.55 мг/г); основными соединениями стеблей являются изокверцитрин (2.80 мг/г), 1-*O*-кофеил-глюкоза (2.25 мг/г) и 3-*O*-кофеилхинная кислота (2.14 мг/г) (табл. 2).

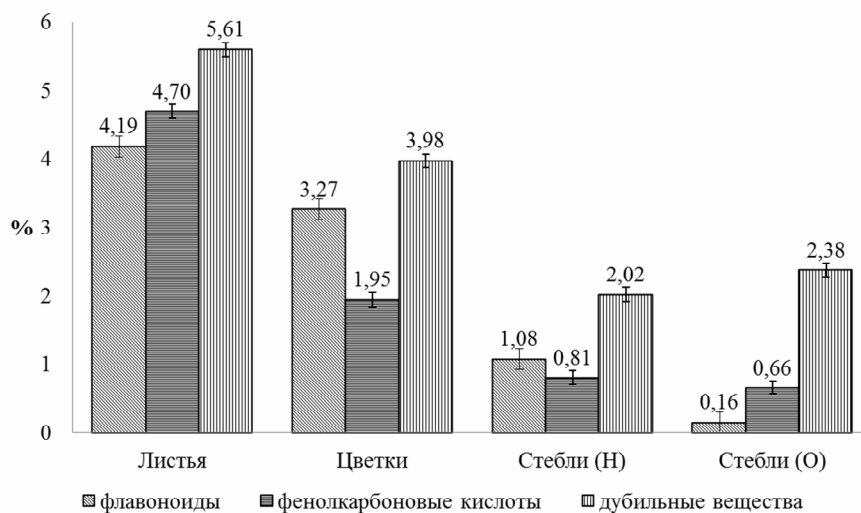


Рис. 2. Содержание фенольных соединений в надземных органах *S. salicifolia*. Стебли: Н – стебли неодревесневшие, О – стебли одревесневшие.

Изучение динамики накопления флавоноидов, фенолкарбоновых кислот и дубильных веществ по фазам вегетации показало, что максимум их содержания отмечается в период цветения (рис. 3).

По результатам изучения распределения и динамики накопления фенольных соединений в качестве лекарственного растительного сырья рекомендованы побеги *S. salicifolia* текущего года жизни, заготавливаемые в период цветения.

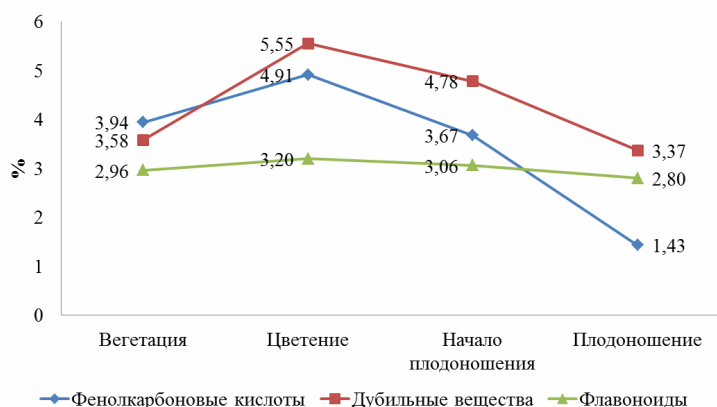


Рис. 3. Динамика накопления фенольных соединений по фазам вегетации в побегах *S. salicifolia*. Место сбора: окр. с. Ново-Грудиного (Иркутской обл.).

Следует отметить, что количественное содержание флавоноидов и фенолкарбоновых кислот может незначительно колебаться в зависимости от места сбора сырья (табл. 5).

Таблица 5. Содержание флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в побегах *S. salicifolia* из разных мест сбора. %

Место сбора (дата)	Флавоноиды	Фенолкарбоновые кислоты
Иркутская область, Иркутский район, окр. с. Ново-Грудиного (10.07.2009)	3,83±0,10	4,31±0,13
Там же, окр. пос. Большая речка (15.07.2009)	4,18±0,11	4,75±0,12
Там же, окр. пос. Большой Калей (04.07.2010)	3,94±0,09	3,67±0,10
Иркутская область, Усольский район, окр. с. Шаманка (17.07.2009)	4,05±0,10	4,51±0,11
Респ. Бурятия, окр. п. Танхой (24.07.2011)	3,78±0,11	5,61±0,12

Макро- и микроскопическое исследование представителей рода *Spiraea*

В поперечном срезе лист *S. salicifolia* дорзовентральный, столбчатая паренхима однорядная, на нижней стороне листа эпидермис сосочковидный. Проводящий пучок центральной жилки коллатеральный, окружен склеренхимой.

Эпидермис верхней стороны листа с прямыми многоугольными стенками, клетки нижнего эпидермиса извилистые с многочисленными устьицами аномоцитного типа.

Волоски двух типов – одноклеточные тонкостенные (170-200 мкм) и толстостенные (740-890 мкм). Клетки эпидермиса у основания тонкостенных волосков образуют 5-6 лучевую розетку. В мезофилле листа встречаются многочисленные крупные друзы. Клетки эпидермиса наружной и внутренней стороны венчика многогранные сосочковидные, устьица редкие (рис. 4).

На внутренней стороне чашечки находится мелкогородчатый цветочный диск, у которого в основной паренхиме располагаются многочисленные мелкие друзы (рис. 5). Чашечка покрыта тонкостенными волосками, на зубцах чашечки многочисленные толстостенные волоски.

Для выявления отличительных микроскопических признаков *S. salicifolia* исследовали анатомическое строение листьев других видов рода *Spiraea*, наиболее часто встречающихся в Восточной Сибири. В результате установили, что сосочковидные выросты хорошо выражены на нижней стороне листа у *S. salicifolia*, *S. flexuosa* и *S. alpine*. Волоски тонкостенные, одноклеточные имеются у *S. salicifolia*, *S. pubescens*, *S. dahurica*, *S. alpine*. Листья *S. aquilegifolia* густо покрыты извилистыми волосками.

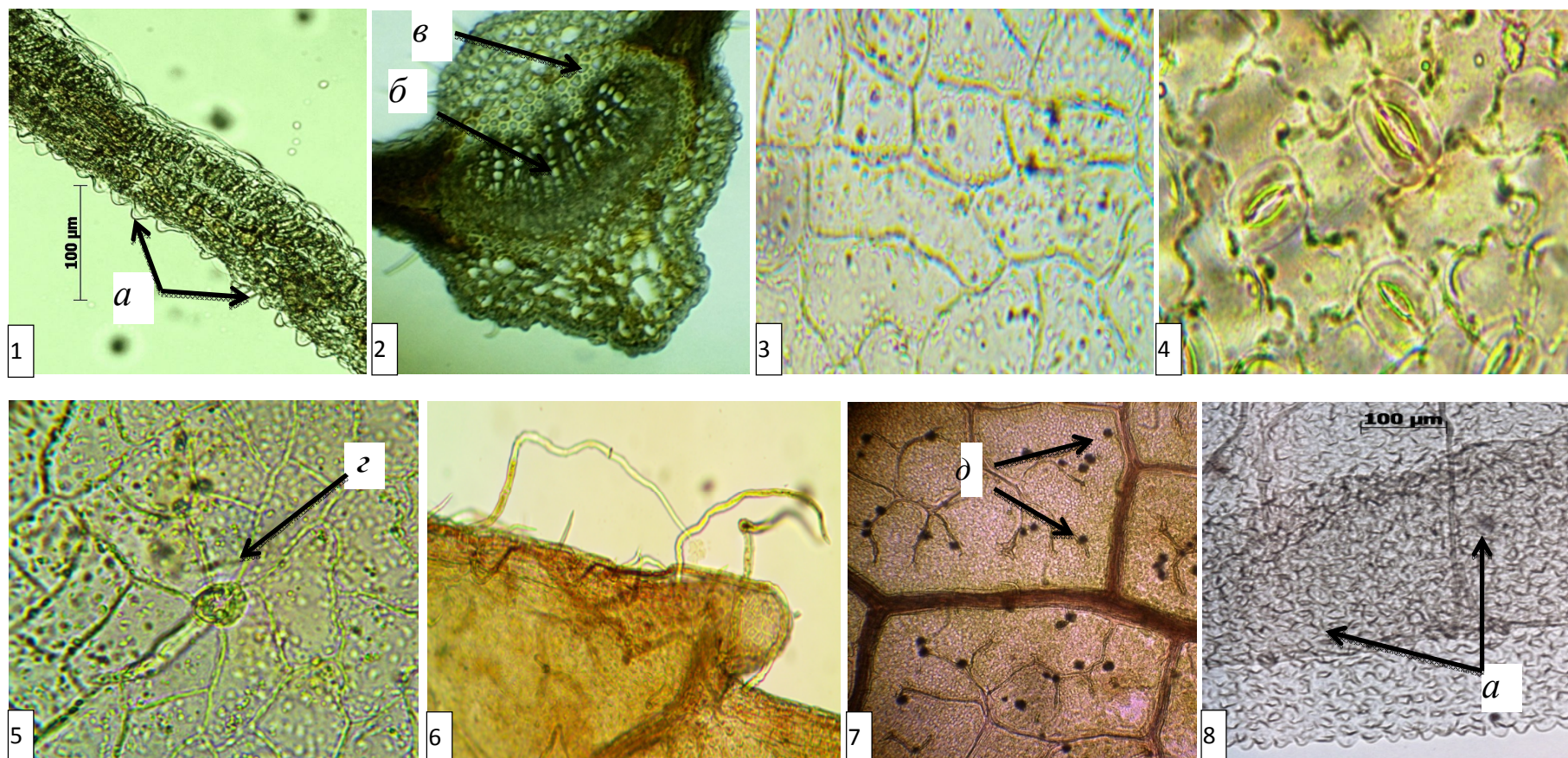


Рис. 4. Фрагменты микроскопического строения *S. salicifolia*. *Лист*: поперечный срез (1) *a* – сосочковидные выросты; центральная жилка (2) *б* – проводящий пучок, *в* – склеренхима; верхний эпидермис (3); нижний эпидермис (4); волосок тонкостенный (5) *з* – розетка; толстостенные волоски (6); кристаллические включения (7) *д* – друзы. Венчик (8) *a* – сосочковидные выросты.

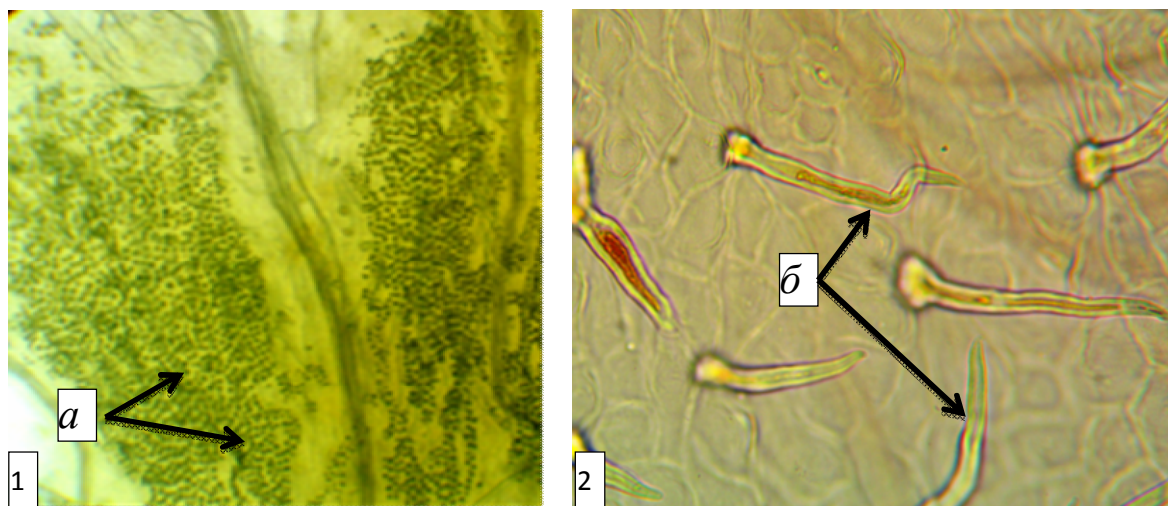


Рис. 5. Фрагменты микроскопического строения цветка *S. salicifolia*. Цветочный диск (1) и чашечка (2): *a* – друзы, *б*-одноклеточные тонкостенные волоски.

По краям листовой пластинки встречаются толстостенные волоски у *S. media*, *S. flexuosa*, *S. dahurica*, *S. aquilegifolia*, *S. salicifolia*. В мезофилле листа обилие друз у всех изучаемых видов, кроме *S. dahurica*, у которой друзы локализируются по жилкам. У *S. alpine* друзы располагаются в мезофилле листа и по жилкам. Отличия *S. salicifolia* заключаются в строении и размерах волосков, в расположении друз, наличии сосочковидных выростов.

Стандартизация и разработка нормативной документации на сырье «Спиреи иволжистой побеги»

Для количественной оценки содержания флавоноидов в сырье было предложено использовать метод дифференциальной спектрофотометрии. В качестве стандартного образца выбран ГСО рутина, т.к. его максимум поглощения при добавлении алюминия хлорида близок к максимуму поглощения спиртового извлечения из *S. salicifolia* (рис. 6).

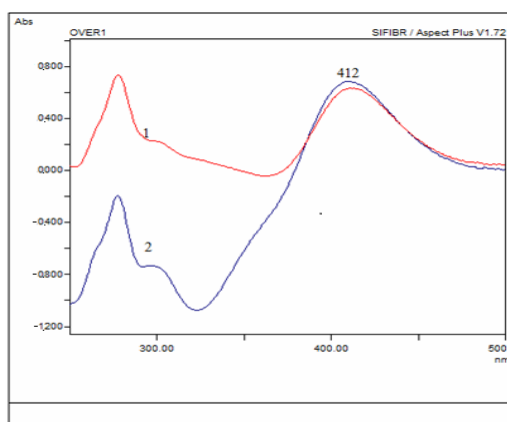


Рис. 6. Спектры ГСО рутина (1) и спиртового извлечения из побегов *S. salicifolia* (2) с 1% раствором алюминия хлорида.

При разработке методики количественного определения подобраны оптимальные условия анализа: экстрагент – 40% спирт этиловый, степень измельчения сырья – 1 мм, соотношение сырья и экстрагента 1:100, время экстракции – 60 мин.

На основании проведённых 9 независимых определений установлено, что ошибка методики не превышает 2,92% (табл. 6).

Таблица 6. Метрологические характеристики методик количественного определения суммарного содержания флавоноидов и фенолкарбоновых кислот в побегах *S. salicifolia*

f	\bar{x}	S	$S\bar{x}$	$P, \%$	$t(P, f)$	$\Delta\bar{x}$	\bar{E}
<i>Флавоноиды</i>							
8	3,84	0,14247	0,04749	95	2,36	±0,112	±2,92
<i>Фенолкарбоновые кислоты</i>							
8	4,92	0,15898	0,05299	95	2,36	±0,13	±2,64

Для количественного определения фенолкарбоновых кислот предложен метод прямой спектрофотометрии с использованием в качестве стандартного образца кофейной кислоты, т.к. максимум поглощения спиртового извлечения *S. salicifolia* находится при 325 нм и близок к таковому РСО кофейной кислотой. Оптимальные условия извлечения фенолкарбоновых кислот из сырья совпадают с предложенными условиями экстракции флавоноидов. При 9 независимых определений, ошибка методики составляла 2,64% (табл. 6).

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

По результатам товароведческого анализа разработаны показатели качества сырья *S. salicifolia*, которые включены в проект ФСП (табл. 7). При изучении сроков годности стабильность показателей качества сырья сохранялась в течение 2,5 лет.

Разработка способа получения и стандартизация экстракта сухого

Получение препаратов из растительного сырья в виде экстрактов сухих вместо настоев и отваров выгодно с точки зрения экономичности и рациональности использования лекарственного сырья. Установлено, что максимальное количество экстрактивных веществ, флавоноидов и фенолкарбоновых кислот извлекается из сырья *S. salicifolia* с использованием 40% спирта этилового. Оптимальный размер частиц сырья 2 мм, соотношение сырья и экстрагента 1:14, температура экстракции 55 - 60°C. Использование более высокой температуры в данном случае невыгодно с экономической точки зрения. Предложено 3 ступени экстракции: 1-ая ступень – 120 мин, 2-ая ступень – 90 мин, 3-я ступень – 60 мин. Эффективность экстракции при этом составляет 85,33%.

Таблица 7. Спецификация к ФСП «Спиреи иволистной побеги»

ПОКАЗАТЕЛИ	НОРМЫ	
	цельное	измельченное
Качественные реакции: - флавоноиды (проба с алюминия хлоридом)	Желтое окрашивание	
Хроматография (ТСХ)	Обнаруживается 4 зоны	
Суммарное содержание флавоноидов в пересчете на рутин, %, не менее	2,5	2,5
Суммарное содержание фенолкарбоновых кислот в пересчете на кофейную кислоту, %, не менее	3	3
Экстрактивных веществ, извлекаемых 40% спиртом этиловым, не менее	20	20
Влажность, %, не более	13	13
Зола общая, %, не более	10	10
Зола, нерастворимая в 10% растворе хлористоводородной кислоты, %, не более	3	3
Стебли одревесневшие, %, не более	10	10
Части сырья пожелтевшие и побуревшие, %, не более	3	3
Частицы, проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 1 мм, %, не более	5	-
Частицы, не проходящие сквозь сито с отверстиями диаметром 7 мм, %, не более	-	10
Частицы, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 0,5 мм, %, не более	-	10
Органическая примесь, %, не более	1	1
Минеральная примесь, %, не более	1	1
Срок годности	2,5 года	2,5 года

В составе экстракта обнаружено содержание флавоноидов, дубильных веществ, фенолкарбоновых кислот, полисахаридов, кумаринов, сапонинов, аминокислот. По качественному составу экстракт сухой соответствует сырью *S. salicifolia*, отличия заключаются в более высоком количественном содержании БАВ.

Для стандартизации экстракта сухого предложены качественные реакции, тонкослойная хроматография. Для количественного определения флавоноидов и фенолкарбоновых кислот адаптированы методики, предложенные для стандартизации сырья *S. salicifolia*. Относительная ошибка методики количественного определения суммы флавоноидов не превышала 2,35%, суммы фенолкарбоновых кислот - не более 2,56% (табл. 8).

По результатам анализа 5 серий экстракта сухого установлена норма содержания суммы флавоноидов в экстракте сухом «не менее 6,0%», суммы фенолкарбоновых кислот «не менее 6,0%». Срок годности экстракта сухого – 2 года.

Таблица 8. Метрологические характеристики методик количественного определения суммы флавоноидов и суммы фенолкарбоновых кислот в экстракте сухом

f	\bar{x}	S	$S\bar{x}$	$P, \%$	$t(P, f)$	$\Delta\bar{x}$	\bar{E}
<i>Флавоноиды</i>							
8	6,75	0,203907	0,067969	95	2,36	$\pm 0,16$	$\pm 2,37$
<i>Фенолкарбоновые кислоты</i>							
8	7,80	0,251346	0,083782	95	2,36	$\pm 0,20$	$\pm 2,56$

Проведенные фармакологические исследования показали, что экстракт сухой *S. salicifolia* обладает противовоспалительным, мочегонным и антиоксидантным действием.

ВЫВОДЫ

1. Впервые проведено комплексное фитохимическое исследование *S. salicifolia*, произрастающей на территории Восточной Сибири, в результате которого было идентифицировано более 20 соединений, в т.ч. впервые для вида спиреозид, кофейная, феруловая, 3-*O*-, 4-*O*-кофеилхинные кислоты, 1-*O*-кофеил-глюкоза, дигидрокверцетин, (+)-катехины, проциандин В1, цианидин. В составе терпеноидных соединений впервые обнаружены вербенон, *E*-оцименон, гексагидрофарнезиллацетон, изопулегол, лонгипинан, дегидроабиетиновая кислота и ее метиловый эфир, глицирризиновая, урсоловая и олеаноловая кислоты. Исследование полисахаридных компонентов *S. salicifolia* показало, что в их состав входят арабиноза, рамноза, глюкоза, галактоза, ксилоза и галактуроновая кислота. В составе аминокислот идентифицировано 21 соединение и этаноламин. Жирные кислоты представлены 8 компонентами (пальмитиновая, стеариновая, линолевая, линоленовая, арахидоновая, бегеновая, трикозановая, лигноцериновая кислоты); алифатические углеводороды – 8 соединениями (гексилгептадекан, октадекан, пентакозан, эйкозан, генейкозан, докозан, трикозан, тетракозан). Установлено содержание в надземных органах *S. salicifolia* 9 макро-, 54 микро- и ультрамикроэлементов.
2. По результатам изучения динамики накопления основных биологически активных веществ по органам и фазам развития в качестве лекарственного растительного сырья предложены побеги *S. salicifolia* текущего года жизни, заготавливаемые в период цветения. Показано, что для цветков *S. salicifolia* характерно накопление 3-*O*-кофеилхинной кислоты, астрагалина и гиперозида; для листьев – 1-*O*-кофеил-глюкоза, рутина и изокверцитрина; для стеблей – изокверцитрина, 1-*O*-кофеил-глюкоза и 3-*O*-кофеилхинной кислоты. Выявлено, что в листьях преобладают γ -аминомасляная кислота, цистеин и цитруллин; в цветках – аспарагин, аланин и глутаминовая кислота.
3. На основании сравнительного анализа видов рода *Spiraea*, произрастающих в Восточной Сибири, установлены основные макро- и

микроскопические диагностические признаки, включающие особенности строения и размеры волосков, расположение друз и наличие сосочковидных выростов.

4. Предложены методики определения подлинности сырья *S. salicifolia* и методики количественного определения суммарного содержания флавоноидов и фенолкарбоновых кислот спектрофотометрическим методом. Валидационный анализ показал соответствие методик критериям правильности, прецизионности, специфичности и линейности. Установлены числовые показатели качества сырья, включенные в проект ФСП «Спирей иволистной побеги».
5. Разработана технология получения и методы стандартизации экстракта сухого. Оптимальные параметры экстракции включают размер частиц сырья – 2 мм, соотношение сырье:экстрагент – 1:14, температура экстракции – 55-60°C, 3 ступени экстракции (120, 90 и 60 мин).

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Кривошеев, И.М. Содержание и состав полисахаридов спирей иволистной (*Spiraea salicifolia* L.) / И.М. Кривошеев, В.М. Минович, Г.М. Федосеева // Сибирский медицинский журнал. – 2011. – №2. – С. 116-118.
2. Krivosheev, I.M. Biology-phytochemical investigations aboveground organs (*Spiraea salicifolia* L.) / I.M. Krivosheev, V.M. Mirovich, G.M. Fedoseeva // Renewable Wood and Plant Resource. Возобновляемые лесные и растительные ресурсы: химия, технология, фармакология, медицина. Тезисы докладов. – Санкт-Петербург, 2011. – С. 107-108.
3. Кривошеев, И.М. Фенольные соединения спирей иволистной (*Spiraea salicifolia* L.) побегов, произрастающей в Восточной Сибири / И.М. Кривошеев, Минович В.М., Г.М. Федосеева, М.В. Андриевская // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник научных трудов. – Пятигорск, 2011. – С. 123 – 124.
4. Кривошеев, И.М. Спирей иволистная (*Spiraea salicifolia* L.) – источник биологически активных веществ противовоспалительного действия / И.М. Кривошеев, В.М. Минович, А.В. Цыренжапов // Актуальные вопросы охраны населения регионов Сибири: материалы конференции. – Красноярск, 2011. – С. 120-122.
5. Минович, В.М. Исследование состава терпеноидов надземных органов спирей иволистной (*Spiraea salicifolia* L.) методом хромато-масс-спектрометрии / В.М. Минович, Г.М. Федосеева, И.М. Кривошеев, Т.А. Коненкина, В.А. Маняк // Вестник Бурятского государственного университета. – 2012. – спецвыпуск С. – С.104-109.
6. Минович, В.М. Изучение элементного состава надземных органов спирей иволистной (*Spiraea salicifolia* L.) / В.М. Минович, Г.М.

- Федосеева, И.М. Кривошеев // Вестник Бурятского государственного университета. – 2012. – спецвыпуск С. – С.109-112.**
7. Мирович, В.М. Макро- и микроскопические особенности листьев некоторых представителей рода спиреи (*Spiraea L.*) / В.М. Мирович, И.М. Кривошеев, Г.И. Бочарова, И.С. Ходырев // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник научных трудов. – Пятигорск, 2012. – Вып. 67. – С. 86-88.
 8. **Кривошеев, И.М. Изучение химического состава надземных органов спиреи иволистной (*Spiraea salicifolia L.*) методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / И.М. Кривошеев, В.М. Мирович // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – № 2. – С. 104-105.**
 9. Кривошеев, И.М. Качественный и количественный состав аминокислот спиреи иволистной (*Spiraea salicifolia L.*) / И.М. Кривошеев, В.М. Мирович, Г.М. Федосеева // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник научных трудов. – Пятигорск, 2012. – Вып. 67. – С. 53-54.
 10. Кривошеев, И.М. Исследование органических кислот спиреи иволистной, произрастающей в Прибайкалье / И.М. Кривошеев // Актуальные вопросы современной медицины: материалы 80-й юбилейной Всероссийской Байкальской научно-практической конференции. – Иркутск, 2012. – С. 225.
 11. Мирович, В.М. Разработка показателей и норм качества побегов спиреи иволистной / В.М. Мирович, И.М. Кривошеев, В.В. Гордеева // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции: сборник научных трудов. – Волгоград, 2013. – Вып. 68. – С. 67-68.
 12. Кривошеев, И.М. Фармакогностическое исследование надземных органов спиреи иволистной (*Spiraea salicifolia L.*), произрастающей в Восточной Сибири / И.М. Кривошеев, А.Т.-Б. Базарова // Материалы VII международной конференции молодых ученых-медиков. – Курск, 2013. – С. 117-120.
 13. **Мирович, В.М. Противовоспалительное действие спиреи иволистной экстракта сухого / В.М. Мирович, А.В. Цыренжапов, И.М. Кривошеев, В.В. Гордеева // Вестник Восточно-Сибирского государственного университета технологий и управления. – 2013. – №6. – С.107-111.**
 14. Мирович, В.М. Исследования по разработке нормативной документации на сырье спиреи иволистной / В.М. Мирович, И.М. Кривошеев, Бочарова Г.И., А. Т.-Б. Базарова // Вопросы естествознания. – 2013. – № 1 (1). – С. 30 -34.

Автор выражает глубочайшую благодарность и признательность старшему научному сотруднику лаборатории химико-фармацевтических исследований ФГБУН «Института общей и экспериментальной биологии» СО РАН, доктору фармацевтических наук, Даниилу Николаевичу Оленникову, за помощь в проведении хроматографических исследований.