

НАО «Медицинский Университет Астана»

УДК: 615.03:615.322:581.192

МПК: А 61 К 36-28, В 01 D 11/02

Марғұлан Азиза Султанбекқызы

СЕРПУХА ВЕНЦЕНОСНАЯ SERRATULA CORONATA L.

ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ СЕРПУХИ

ВЕНЦЕНОСНОЙ КАК ЛЕКАРСТВЕННОЕ РАСТИТЕЛЬНОЕ СЫРЬЕ

7М10104 «Фармация»

Диссертация на соискание академической степени
магистра медицинских наук

Научный руководитель:

д.фарм.н., профессор Шукирбекова А.Б. _____

Научный консультант:

к.б.н., доцент Атимтайқызы А. _____

Рецензент:

Доктор PhD Ташенов Е.О. _____

Астана 2023 г.

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ.....	3
ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	4
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ	5
СПИСОК ТАБЛИЦ И РИСУНКОВ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1 Серпуха венценосная – перспективный источник биологически активных веществ	10
1.2 Систематическое положение, ареал, местообитание, сырьевые ресурсы серпухи венценосной	11
1.3 Описание главных биологически активных веществ, содержащихся в растениях рода Серпуха	15
1.4 Использование растения серпухи в народной медицине	20
1.5 Качественные и количественные методы, проведенные на серпуху венценосной	24
ГЛАВА 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ (ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ)	26
2.1 Характеристика объекта исследования	26
2.2 Методы исследования	26
ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ.....	27
3.1 Методы выделения из растительного сырья	27
3.2 Фитохимические методы анализа	29
3.3 Статистические методы анализа	49
ВЫВОДЫ	50
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	51

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

1. Государственная фармакопея Республики Казахстан

ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации использованы следующие термины с соответствующими определениями:

1. *Государственная фармакопея (ГФ)* - сборник государственных стандартов качества ЛС, имеющий законодательный характер.

2. *Извлечение (вытяжка)* - полупродукт, получаемый в результате экстрагирования растительного сырья растворителем.

3. *Субстанция* - вещество относится к материалу, полученному из растений, животных, микроорганизмов или полученному синтетическим путем, который обладает фармакологической активностью и используется при разработке и производстве лекарственных средств.

4. *Экстракты* - представляют собой высококонцентрированные препараты жидкой, твердой или густой консистенции, обычно получаемые из высушенного растительного или животного сырья. Они получены с помощью процесса, который извлекает и концентрирует активные компоненты из исходного материала.

5. *Алкалоиды* - это природные азотсодержащие органические соединения основного характера, имеющие сложный состав и обладающие сильным физиологическим действием. Азот в алкалоидах чаще располагается в гетероциклах, реже в боковой цепи.

6. *Кумарины* - это группа природных соединений, химическая структура которых основана на бензо- α -пироне, представляющем собой лактон, полученный из цис-орто-гидроксикоричной кислоты.

7. *Терпеноиды* - органические соединения, содержащие кислород, углеродный скелет которых образован из изопреновых звеньев.

8. *Флавоноиды* - это группа природных биологически активных фенольных соединений - производных бензо- u -пирона. Это гетероциклические соединения с атомом кислорода в кольце. В зависимости от степени окисления флавоноиды делятся на несколько групп.

9. *Эфирные масла* - продукты растительного происхождения, являющиеся многокомпонентными смесями летучих душистых веществ и относящиеся к различным классам органических соединений.

ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

АО - антиоксидант

АОА - антиоксидантная активность

БАВ - биологически активные вещества

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ВЭЖХ-СФД - высокоэффективная жидкостная хроматография со спектрофотометрическим детектором

ВЭЖХ-МС - высокоэффективная жидкостная хроматография с масспектрофотометрическим детектором

ЛС - лекарственное сырье

ОВР - окислительно-восстановительная реакция

ОФ - обращенно-фазовая

ПФ - подвижная фаза

СФ - стационарная фаза

ТФЭ - твердофазная экстракция

ТСХ - тонкослойная хроматография

ХГФВ - хроматография гидрофильных взаимодействий

СПИСОК ТАБЛИЦ И РИСУНКОВ

- Таблица 1 Распространение видов серпухи
- Таблица 2 Сравнительная ботаническая характеристика представителей рода серпуха флоры Казахстана
- Таблица 3 Основные представители биологически активных веществ рода серпухи
- Таблица 4 Хромато-масс-спектрометрия, выделенных эфирных соединений
- Таблица 5 Количественное содержание компонентов в эфирном масле
- Таблица 6 Результаты количественного определения БАВ в надземной части серпухи венценосной
- Таблица 7 Результаты количественного определения полисахаридов
- Таблица 8 Изменение ОП растворов в зависимости от концентрации рабочих растворов
- Таблица 9 Результаты исследования цитотоксической активности
- Таблица 10 Изменение оптической плотности исследуемых растворов с изменением концентрации
- Таблица 11 Антирадикальная активность (%) экстрактов при разных концентрациях
- Рисунок 1 Аппарат Сокслет
- Рисунок 2 Хроматограмма суммы флавоноидов выделенный из надземной части серпухи венценосной
- Рисунок 3 Схема хроматограммы аскорбиновых кислот
Аминокислотный состав в надземной части серпухи венценосной
- Рисунок 4 Схема хроматограммы кумаринов
- Рисунок 5 Схемы ВЭЖХ аминокислотного состава в надземной части серпухи венценосной
- Рисунок 6 Хромато-масс-спектры компонентов эфирных масел серпухи венценосной
- Рисунок 7 Влияние концентрации веществ на изменение антиоксидантной активности
- Рисунок 8 Динамика антирадикальной активности при изменении концентрации веществ

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы:

В настоящее время в мире вновь наблюдается тенденция к росту потребности в лекарственных растительных средствах (ЛРС), которые наряду с относительной безопасностью и возможностью длительного применения имеют достаточную эффективность и широту терапевтического действия, обусловленную поливалентностью биологически активных веществ (БАВ).

Серпуха венценосная – *Serratula coronata* L., семейство Asteraceae. В народной медицине используются настои, при воспалительных и инфекционных заболеваниях (диспепсия, фарингит, тонзиллит и другие), а также при неврозах и психических заболеваниях. В научных источниках в серпухе венценосной в надземной части содержатся такие соединения как: флавоноиды, терпеноиды, кумарины, а также полисахариды, каротиноиды, аскорбиновая кислота, алкалоиды.

В доступной литературе отсутствуют результаты фармакогностического изучения серпухи венценосной в РК, в связи с этим, тема является актуальной. Поэтому тщательное изучение химического состава серпухи венценосной увеличивает спектр применения в медицине.

Цель исследования:

Целью исследования явилось обоснование возможности использования серпухи венценосной в научной медицине на основании результатов фармакогностических и фармакологических исследований.

Задачи исследования:

1. Ботаническое описание лекарственного растительного сырья серпухи венценосной с помощью макроскопического анализа.
2. Изучение внутреннего строения с помощью микроскопического анализа.
3. Изучение биологически активных веществ с помощью фитохимического анализа.

Объект и предмет:

Лекарственное растительное сырье серпуха венценосная *Serratula coronata* L. Надземная часть (листья).

Методы исследования:

1. Макроскопический анализ
2. Микроскопический анализ
3. Химические методы исследования для определения биологически активных веществ.
4. Количественный анализ: Спектрофотометрический метод

Научная новизна исследования:

Научная новизна исследования заключается в том, что будут использованы известные химические методы для определения основных биологически активных веществ в серпухе венценосной.

Практическая значимость:

Результаты исследований лекарственного растительного сырья, которые могут найти применение в медицине.

Результаты диссертационной работы могут быть использованы в учебном процессе по курсу «Фармакогнозия».

База проведения исследования:

Кафедра фармацевтических дисциплин НАО «Медицинский университет Астана», г.Нур-Султан.

База проведения исследования:

Кафедра фармацевтических дисциплин НАО «Медицинский университет Астана», г.Нур-Султан.

Научно-исследовательский институт новых химических технологий ЕНУ им. Л.Н. Гумилева.

Положения, выносимые на защиту:

1. Методика качественного определения основных действующих веществ серпухи венценосной методом тонкослойной хроматографии, высокоэффективной жидкостной хроматографии.

2. Методика количественного состава основных действующих веществ серпухи венценосной методом УФ-спектрофотометрии.

Объем и структура диссертации:

Диссертация изложена на 61 страницах текста компьютерного набора и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследования, заключения, списка литературы, включающего 143 источников, из которых 70 на иностранном языке и приложения. Диссертация иллюстрирована 8 рисунками, 11 таблицами.

Глава 1 посвящена обзору литературы. Систематическое положение, ареал, местообитание, сырьевые ресурсы серпухи венценосной, описание главных биологически активных веществ, содержащихся в растениях рода серпухи, ранее проведенные исследования на серпуху венценосную, применение в народной медицине.

В главе 2 представлена характеристика объекта и методов исследования. Приведены методики качественного и количественного определения основных групп биологически активных веществ серпухи венценосной.

В главе 3 в экспериментальной части приводятся результаты разработки методики качественного и количественного состава основных биологически активных веществ серпухи венценосной.

В заключении сформулированы основные результаты проведенных исследований, разработка методики определения качественного и количественного определения основных групп биологически активных веществ серпухи венценосной.

Результаты, полученные при проведении исследований, обработаны статистически и представлены в таблицах, на рисунках, выражены в соответствующих формулах, которые приведены в тексте диссертации.

Апробация работы:

Апробация прошла в НАО «МУА» на кафедре фармацевтических дисциплин.

По материалам диссертации опубликованы и 5 работ, в том числе 2 доклада на международных конференциях.

- Международной научно-практической конференции «Современная фармация: Новые подходы в образовании и актуальные исследования», приуроченная к 20-летию факультета фармации. «Серпуха венценосная (*Serratula coronata* L.) – перспективный источник лекарственного растительного сырья». Публикация тезиса.

- Научно-практической конференции «Наука и здоровье» посвященная дню науки Республики Казахстан с международным участием «Студенческая наука и здоровье». «Особенности биологически активных веществ в серпухе венценосной *Serratula coronata* L.». Публикация тезиса.

- В Республиканском журнале «Вестник ЮКМА» №4 (98), том VII, 2022 год. «Виды рода Серпухи *Serratula* и их распространение» . Публикация тезиса.

- Международной научно-практической конференции, посвященной 85-летию Ташкентского фармацевтического института «Современное состояние фармацевтической отрасли: проблемы и перспективы». Ташкент 2022 г. «Фармакогностическое изучение листьев серпухи венценосной (*serratula coronata* L.)». Публикация тезиса и выступление с устным докладом.

- XVIII научно-практической конференции молодых ученых и студентов ГОУ ТГМУ им. Абуали ибни Сино «Наука и инновации в медицине – 2023». (Республика Таджикистан, Таджикский государственный медицинский университет им. Абуали ибни Сино). «Определение антиоксидантной активности в серпухе венценосной». Публикация тезиса и выступление с устным докладом.

ГЛАВА 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Серпуха венценосная – перспективный источник биологически активных веществ

Род *Serratula* L. - небольшой род семейства астровых, включающий около 70 видов, которые встречаются в различных регионах, включая Европу, Азию, Северную Америку, Японию и Китай. [1]. Род *Serratula* L. является перспективным, в связи с обнаружением в нем нового класса биологически активных веществ - фитоэкдистероидов, обладающих стимулирующим и адаптогенным действием [2, 3, 4, 5]. Во флоре Казахстана род *Serratula* представлен 8 видами [6]. Данные по эколого-географическому распространению видов данного рода, произрастающих на территории Казахстана обобщены в таблице 1. В таблице 1 показывают, что экологическая связывающая растений этого рода чрезвычайно разнообразна. Растут на разных каменистых склонах.

Таблица 1 - Распространение видов серпухи

Виды	Ареал	Местообитание
1. <i>S. coronata</i> L. - Серпуха венценосная, обыкновенная	Северная Евразия, Италия, Дальний Восток, Казахстан	Мелколиственные, сосновые и черновые леса и опушки, высокотравные, лесные, степные, пойменные луга
2. <i>S. manshurica</i> Kitag. - Серпуха маньчжурская	Вост. Сибирь, Монголия, Китай, Дальний Восток, Вост. Казахстан	Высокотравные луга и кустарниковые заросли
3. <i>S. centauroides</i> L. - Серпуха васильковая	Вост. Монголия, Вост. Казахстан	Каменистые склоны, высокотравные
4. <i>S. komarovii</i> Iljin - Серпуха Коморова	Сев.Казахстан, Дальний Восток, Монголия, Китай, Япония	Каменистые сухие склоны
5. <i>S. cardunculus</i> (Pall.) Schischk. - Серпуха чертополоховая	Юго-Вост. Европа, Средняя Азия, Западный Сибирь, Монголия	Остепненные, солонцеватые луга, берега соленых озер, пустынные степи

Продолжение таблицы 1

6. <i>S. marginata</i> <i>Tausch.</i> Серпуха окаймленная	Западный Сибирь, Азия, Монголия, Китай	Равнинные и горные степи, каменистые склоны
7. <i>S. algida</i> Iljin. - Серпуха вольфа	Сибирь, Азия	Скалы, каменистые и щебнистые склоны в альпийском поясе, кедровые и лиственничные леса
8. <i>S. kirghisorura</i> Iljin - Серпуха киргизова	Сибирь, Восток	Горные, солонцеватые и глинисто-каменистые степи

Серпуха венценосная – многолетнее травянистое растение, достигающее высоты от 40 до 150 см. У нее горизонтальное деревянистое корневище с многочисленными придаточными корнями. Стебель голый, ребристый и ветвистый, верхняя часть опадающая. Зеленые листья глубоко перисто-рассеченные, с более крупной концевой долей и легкой волосистостью с нижней стороны вдоль жилок. Нижние листья черешковые, размером 10-40 см в длину и 3-15 см в ширину, в то время как верхние листья сидячие и мельче. Ланцетные или яйцевидные доли листьев крупно-пилообразные, с хрящевыми шипами на концах зубцов. У них также есть маленькие колючие реснички по краям. Растение имеет 6-8 пар боковых лепестков длиной 3-12 см и шириной 1-5 см, идущих вниз по черешку. Верхняя пара сливается с концевой долей.

Крупные корзинки, расположенные на концах ветвей и стебля, имеют красноватый оттенок или покрыты короткими прижатыми волосками. У красновато-коричневых прессованных оберточных листьев наружные заостренные, а внутренние линейно-ланцетные. Венчики от пурпурного до пурпурового цвета, а некоторые краевые цветки исключительно женские, с узким, 3-4 надрезанным венчиком и недоразвитыми или отсутствующими тычинками. Коричневая семянка достигает 4-5 мм в длину и гладкая. Растение цветет в июле-августе.

1.2 Систематическое положение, ареал, местообитание, сырьевые ресурсы серпухи венценосной

Серпуха венценосная имеет обширный ареал: юго-запад Европейской части бывшего СССР, Кавказ, Западная и Восточная Сибирь, Дальний Восток, Средняя Азия и широкую эколого-фитоценологическую амплитуду произрастания. Она приурочена к лесной и степной зонам, встречается в различных растительных сообществах: на разнотравно-злаковом и осоково-разнотравном лугах, в разреженном разнотравном березовом, березово-осиновом, березово-лиственничном лесах, на травянистых горных склонах [6, 7]. Серпуха венценосная в природе встречается рассеянно, небольшими группами по 5-20 генеративных побегов, больших зарослей не образует и ее

заготовка в природе нерентабельна [7, 8]. В связи с этим встает вопрос о введении данного вида в культуру. Целесообразность введения лекарственных растений в культуру обусловлена рядом преимуществ: компактность размещения площадей, возможность одновременного использования плантаций в пищевых, кормовых и медицинских целях. Промышленная культура по сравнению с ресурсными заготовками гарантирует получение лекарственного растительного сырья стандартного качества с учетом контролируемости основных этапов его производства и послеуборочной доработки и сушки. Кроме того, возрастающие потребности в растительном сырье приводят к увеличению заготовок в местах естественного произрастания и, как следствие, к истощению запасов в природе и нарушению природных экосистем, что придает особую актуальность введению в культуру ценных видов растений. Исходя из необходимости культивирования серпухи венценосной, были изучены особенности онтогенеза, выявление факторов, влияющих на устойчивость видов в агропопуляциях и установление оптимальной плотности [9, 10, 11].

Наиболее благоприятные условия для произрастания вида отмечаются в равнинных условиях на Центральном, в Северном Казахстане в березово-осиновых крупнотравных лесах, где совпадают экологический и фитоценотический оптимумы. В данном растительном сообществе наблюдается самая высокая численность, жизненность и продуктивность особей. В возрастных спектрах преобладают средневозрастные генеративные растения. Различия, существующие между дикорастущими растениями в равнинных и горных условиях произрастания по ритму роста и развития, по ряду морфологических признаков, а также по семенной продуктивности, в условиях культуры сохраняются. При интродукции растения равнинного экотипа являются более высокорослыми, крупнолистными, с большим числом генеративных побегов на особь и соцветий на нем. Для них характерна также более высокая потенциальная и реальная семенная продуктивность [11, 12].

Таблица 2 - Сравнительная ботаническая характеристика представителей рода серпуха флоры Казахстана

Виды рода серпухи	Стебли	Листья	Корзинки	Цветки
С.венценосная - <i>S.coronata</i> L.	50-120 см высотой, бороздчатые, угловатые	Не колючезубчатые, простые, перисторассеченные на линейные или линейно-продолговатые сегменты, по краю крупнозубчатые	Скучены по нескольку, образуя щитковидное соцветие, редко одиночные	крупные, пестичные, внутренние - обоеполые. Лиловато-пурпуровые

Продолжение таблицы 2

<p>С. маньчжурская - <i>S. manshurica</i> Kitag.</p>	<p>Не крылатые, 50-120 см высотой, почти голые или слегка опушенные</p>	<p>Не колючезубчатые, на концах сегментов могут быть колючки. Сложные, с 2 парными боковыми частями, конечная доля намного крупнее боковых</p>	<p>Одиночные или многочисленные, шаровидные. Обвертка более 10 мм шириной</p>	<p>Светло-розовые</p>
<p>С. васильковая - <i>S. centauroides</i> L.</p>	<p>10-30 см высотой, угловатые, обычно короче нижних листьев</p>	<p>Простые, у основания лопастные, по краю городчатые</p>	<p>Одиночные верхушечные, полушаровидные, 2,5-4 см в диаметре. Листочки обвертки с длинными, прямыми, отогнутыми крепкими колючками</p>	<p>Пурпуровые</p>
<p>С. кормовая - <i>S. komarovii</i> Iljin.</p>	<p>100 см высотой</p>	<p>Крупные, яйцевидно-ланцетные, глубокие и тонкие зубчатые, с заостренным клиновидным основанием, на длинных черешках.</p>	<p>Одиночные, слегка опущенные</p>	<p>Трубчатые, пурпурно-розовые</p>

Продолжение таблицы 2

<p>С. чертополоховая - <i>S. cardunculus</i> (Pall.) Schischk.</p>	<p>10-25 см высотой</p>	<p>Цельные или неглубоко (до половины или меньше) лопастные, простые</p>	<p>Одиночные, около 1 см в диаметре</p>	<p>Розовые</p>
<p>С. окаймленная - <i>S. marginata</i> Tausch.</p>	<p>10-30 см высотой, угловатые, обычно короче нижних листьев</p>	<p>Простые, у основания лопастные, по краю городчатые</p>	<p>Одиночные верхушечные, полушаровидные, 2,5-4 см в диаметре. Листочки обертки с длинными, прямыми, отогнутыми крепкими колючками</p>	<p>Темно-пурпуровая</p>
<p>С. холодная (большеголовник) - <i>S. algida</i> Пjin.</p>	<p>Не крылатые, 50-120 см высотой, почти голые или слегка опушенные</p>	<p>Не колючезубчатые, на концах сегментов могут быть колючки. Сложные, с 1-2 парами боковых долей, конечная доля намного крупнее боковых</p>	<p>Одиночные или многочисленные, шаровидные. Обертка более 10 мм шириной</p>	<p>Розовые</p>

Продолжение таблицы 2

С. киргизская - <i>S. kirghisorura</i> Цjin.	50-150 см высотой, прямые, бороздчатые, голые	Простые, цельнокрайние, голые, вырезаннозубчатые, кожистые, на коротких черешках	Продолговатые, основание клиновидное. Наружные листочки обвертки слегка желтые, а внутренние - фиолетовые, блестящие, без остроконечия	Светло- розовые
--	---	---	--	--------------------

Таким образом, серпуха венценосная отличается от других видов этого рода практически голым стеблем, на котором расположены не колючезубчатые сложные, с 1-2 парами боковых долей листья с очень крупной конечной долей. Цветочные корзинки либо одиночные, либо многочисленные шаровидной формы с оберткой шириной более 10 мм. [13-19]

1.3 Описание главных биологически активных веществ, содержащихся в растениях рода Серпуха

Литературные данные о биологически активных веществах в серпухе приведены в таблице 3.

Таблица 3 - Основные представители биологически активных веществ рода серпухи

Виды	Виды природных экдистероидов	Группа (ФС) фенольных соединений	Остальные биологически активные вещества	Проведенные исследования (источник литературы)
<i>S. algida</i>	Экдистерон		Сесквитерпеноиды	20, 21, 22
<i>S. bractifolia</i>	-	Кверцетин Кемпферол	-	22

Продолжение таблицы 3

<i>S. centauroides</i>	Экдистерон Витикостерон Е	-	-	20, 21, 22
<i>S. coronata</i> L.	Экдистерон 20иннокостерон Дакрихайнанстерон α-экдизон Полиподина В Таксистероны и Макистероны разных видов и Интегристероны В	Лютеолин Апигенин Кверцетин Рутин Апиин Антоцианы Дубильные вещества Кумарины	Каротиноиды Терпеноиды Аскорбиновая кислота Алкалоиды (малая часть) Аминокислоты Каучук Высшие жирные кислоты (пальмитиновая, линоленовая, линолевая)	9, 18, 20, 31-50
<i>S. erucifolia</i> <i>S. xeranthemoides</i>	Экдистероны Интегристероны В	-	-	20, 22, 51
<i>S. tinctorii</i>	Экдистероны Интегристероны В Полиподины А	Апигенин Лютеолин 3-О-метилкверцетин	Терпеноиды	21, 22, 32, 39, 52, 53
<i>S. manshurica</i>	Экдистероны	-	-	22, 31, 38, 54
<i>S. procumbens</i>	Экдистероны Витикостероны В	-	-	20, 21

Продолжение таблицы 3

<i>S. quinquefolia</i>	Экдистероны Полиподины В, инокостерон Витикостерон Е Согдистерон	Арбутин	-	20, 22
<i>S. sogdiana</i>	Экдистероны Витикостерон Е Согдистерон	Арбутин	-	20, 22, 55, 56, 57, 58
<i>S. strangulatia</i>	Экдистероны Странгузин А и В	-	-	59, 60, 61
<i>S. wolfia</i>	Экдистероны Полиподины А	3-О-метилкемпферол	Терпеноиды	62

Анализ, представленный в таблице 3, показывает наличие фитостероидов, флавоноидов и сесквитерпеноидов в различных видах рода Серпуха. Химический состав рода в основном состоит из фитостероидов и фенольных соединений.

Обширные фитохимические исследования, проведенные как в СССР, так и за рубежом в период 1960-1990-х годов, позволили получить ценную информацию о биологически активных веществах (БАВ), присутствующих в растениях серпухи. Эти исследования показали, что экдистероиды, особенно распространены в растениях Серпухова. Выяснилось, что экдистероиды, которые, как первоначально считалось, в основном содержатся в насекомых и ракообразных в минимальных количествах, широко распространены и в царстве растений.

Первоначальное открытие экдистероидов в растительном сырье можно отнести к 1966 году, когда Коси Наканиши и исследователи из Университета Тохоку в Японии изучали компоненты экстракта листьев *Podocarpus makii*. В ходе своего исследования они идентифицировали четыре родственных соединения, известные как понастероны А, В, С и D. Это открытие стало

важной вехой в понимании экдистероидов и их присутствия в растительных источниках. [63].

После открытия Наканиши дальнейшие исследования привели к выделению соединения 20-гидроксиэкдизона из другого австралийского вида, *Podocarpus elatus*. Было обнаружено, что это соединение идентично гормону линьки, обнаруженному у ракообразных. Интересно, что было обнаружено, что в одном грамме высушенной коры дерева *Podocarpus elatus* содержится больше гормона, чем в одной тонне отходов, образующихся при переработке раков. Эти результаты послужили толчком к широкомасштабному скринингу различных растений на наличие соединений, обладающих активностью гормона линьки насекомых. Ученые были заинтригованы потенциалом этих природных веществ в понимании развития насекомых и изучении их применения. [64]

В 1970-х годах изучение экдистероидов набрало обороты в Советском Союзе. Исследователи Я.К. Яцюк и Г.М. Сегал внесли важный вклад в эту область, сообщив об выделении экдистерона из цветочных корзинок серпухи (*Serratula inermis*). Это открытие расширило знания о присутствии экдистероидов в растительных видах и еще больше подчеркнуло их значение в области фитохимии. Это открытие проложило путь к более обширным исследованиям свойств и потенциального применения экдистероидов в различных областях. [65].

Научные школы, возглавляемые академиком Н.К. Абубакировым в Узбекистане и профессором Ю.Д. Холодовой в Украине, сыграли значительную роль в выявлении новых видов, содержащих экдистероиды, на территории бывшего Советского Союза. Их исследовательские усилия в значительной степени способствовали расширению знаний и пониманию экдистероидов и их присутствия в различных видах растений. В настоящее время скрининговые исследования продолжают активно проводиться в различных учреждениях, включая Ботанический сад Томского государственного университета и Институт биологии Коми НЦ УРО РАН в Сыктывкаре. Эти текущие исследования направлены на изучение и идентификацию дополнительных видов растений, содержащих экдистероиды, что еще больше обогатит наше понимание этих биологически активных соединений и их потенциального применения. [66].

Как указано в таблице 2, качественный состав биологически активных веществ (БАВ) у многих видов все еще неполон или даже отсутствует, несмотря на имеющуюся информацию. Фитоэкдистероиды и фенольные соединения являются основными составляющими химического состава этого рода.

В настоящее время широко изучен экдистероидный состав растений вида *Serratula coronata*. (серпуха венценосная) [67].

Основными компонентами фитоэкдистероидов в *Serratula coronata* являются 20-гидроксиэкдизон, на долю которого приходится примерно 75% от общего количества. Другими важными соединениями, идентифицированными у этого вида, являются 25S-инокостерон и экдизон,

последний является редким примером обнаружения истинного гормона линьки у растений [67-73]. Помимо основных фитоэкдистероидов, упомянутых ранее, растения вида *Serratula coronata* также содержат ряд второстепенных экдистероидов. К ним относятся аджугастерон С, дакрихайнанстерон, полипоид В, таксистерон, мацистероны А и С, витикостерон Е, интегристерон А, а также их сложные эфиры и гликозиды.

Эти второстепенные экдистероиды вносят свой вклад в общий химический состав растения и обеспечивают дополнительное разнообразие с точки зрения их биологической активности и потенциального применения. [74-79].

Сотрудники СибБС (Сибирский ботанический сад) Томского государственного университета провели исследование динамики накопления экдистерона у серпухи венценосной (*Serratula coronata*) как в ее естественной среде обитания в Томской области, так и в контролируемых условиях культивирования. Исследование было сосредоточено на изучении уровней экдистерона в зависимости от различных фаз развития растений и различных органов растения. Анализируя полученные данные, исследователи стремились понять, как содержание экдистерона варьируется на разных стадиях роста растения и в разных частях растения [80].

Результаты исследований указывают на то, что существуют заметные различия в количественном содержании экдистероидов в одних и тех же органах растения серпуха венценосная на разных стадиях его развития. Однако было обнаружено, что качественный состав и сезонная динамика накопления экдистероидов согласуются между растениями, выращенными в культуре, и растениями в их естественной среде обитания. Это говорит о том, что, хотя общие уровни экдистероидов могут колебаться, конкретные типы и закономерности накопления экдистероидов остаются неизменными независимо от условий выращивания [11, 80].

Исследование показало, что наибольшее накопление экдистерона (2%) происходит в надземной части растения в период его вегетации. По мере роста и развития растения содержание экдистерона постепенно снижается до уровня 1,6-1,9%. Ближе к концу вегетационного периода наблюдается значительное снижение содержания экдистерона, достигающее всего 0,3%.

Анализ распределения экдистерона между различными органами показал, что листья растения серпухов накапливают наибольшее количество экдистерона (1,7%) в фазу цветения. По мере того как растение продолжает развиваться, экдистерон транспортируется из листьев к генеративным органам. Это указывает на динамичное перемещение экдистерона внутри растения по мере прохождения им различных стадий роста и репродуктивных фаз. [11, 81].

Исследования, проведенные в отделе кормов Томской областной проектно-изыскательской станции химизации сельского хозяйства, показали, что зеленая масса серпухи по содержанию белка, клетчатки и зольности сопоставима с такими кормовыми культурами, как борщевик, люцерна и окопник. В фазе цветения надземная часть растения серпухов содержит

приблизительно 20,1-20,6% белка, 23,3-28% клетчатки, а уровень каротина колеблется в пределах 130-173 мг/кг. Эти результаты указывают на то, что серпухов может служить ценным источником корма со значительным содержанием питательных веществ, аналогичным другим широко используемым кормовым культурам. [11, 80].

Аминокислотный состав венценовой серпухи был исследован в Институте биологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук. Исследование показало, что в коронованной серпухе высокое содержание аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты и лейцина, в то время как метионин и гистидин присутствуют в небольших количествах. Листья растения не содержат цистина и цистеиновой кислоты. Примерно 40% от общего количества аминокислот в листьях относятся к незаменимым аминокислотам, что указывает на их высокую питательную ценность.

Напротив, почки венценовой серпухи обладают другим аминокислотным профилем. В них высокое содержание пролина, которое примерно в три раза превышает содержание, содержащееся в листьях. Кроме того, почки содержат более высокие уровни метионина, тирозина и небольшое количество цистина, цистеина, валина и фенилаланина. Эти результаты дают представление о специфическом аминокислотном составе различных частей растения серпухи венценовой, подчеркивая их потенциальную питательную ценность и различия в содержании аминокислот в разных органах растения.

Фенольные соединения, особенно флавоноиды, имеют значительное присутствие и важность в комплексе биологически активных веществ, содержащихся в растении серпуха венценовая. Флавоноиды - это разнообразная группа растительных вторичных метаболитов, известных своими различными физиологическими и фармакологическими свойствами. Они способствуют защитным механизмам растения, действуя как антиоксиданты и проявляя противовоспалительную, противомикробную и противоопухолевую активность.

Присутствие фенольных соединений, особенно флавоноидов, подчеркивает потенциал венценовой серпухи как ценного источника природных биологически активных соединений с разнообразными укрепляющими здоровье свойствами. Дальнейшие исследования этих соединений в контексте целебных свойств венценовой серпухи могут дать ценную информацию для применения в фармацевтике, нутрицевтике и функциональных продуктах питания.

Флавоноиды привлекли значительное внимание в области фармакологии из-за обилия доступной достоверной информации об их разнообразных фармакологических эффектах. Эти соединения обладают широким спектром полезных свойств, включая антиоксидантное, спазмолитическое, противовирусное, противоопухолевое, противовоспалительное, противоаллергическое, гепатопротекторное, укрепляющее капилляры, гемореологическое и другие действия [83-88].

1.4 Использование растения серпухи в народной медицине

Использование серпуховских растений было давней практикой в традиционной медицине различных культур и народов. За последние двадцать лет некоторые виды этого рода приобрели значение как источники лекарственных свойств, витаминов, для производства меда и как ценные кормовые культуры.

Народная медицина широко признала венценосный серпуховник ценным лекарственным растением. В разные периоды и в разных местах его называли по-разному, например, горянка, жовтило, заячьи лапы, зеленщик, коровьи языки, медвежьи пальцы, серп, серпук, сопулка, ребро христа и цветок-серпуха.

Настой травы венценосной серпухи имеет различное лечебное применение. Внутрь его используют для лечения таких заболеваний, как желтуха и диарея, в то время как наружно его используют для полоскания горла при ангине, фарингите и тонзиллите, что объясняет одно из его народных названий - горянка. Также имеются свидетельства лечения гонореи при помощи отвара корневищ, которые были собраны осенью. Настои, приготовленные из цветочных корзинок травы, назначают пациентам с эпилепсией, а также при неврозах, параличах, психических заболеваниях и заболеваниях дыхательных путей. Кроме того, травяной настоей применяется местно в качестве ранозаживляющего средства, в виде ванн и лосьонов, при таких состояниях, как экзема, порезы, ссадины и инфицированные раны [89-92]. Серпуха венценосная в народной медицине применяется при анемии, цинге, рвоте, желтухе, грыже, геморрое, злокачественных опухолях [90, 93,94].

В народной медицине также находят применение другие виды данного рода. Так, соцветия серпухи чертополоховой в виде настоя в тибетской медицине используются как гемостатическое, ранозаживляющее средство [95, 96], а надземную часть в виде отвара рекомендуют использовать как анальгезирующее средство в народной медицине Урала [76].

Настой цветков серпухи васильковой использовали в качестве гемостатического средства [97], а листья в Монголии использовали как суррогат чая [98].

В старину надземную часть серпухи красильной в виде ванны использовали как детоксикационное средство при укусах бешеных собак [97].

Корни и надземная часть серпухи красильной использовались как средства для окрашивания шерсти, льна, хлопка в желтый и зеленый цвета [1, 97].

В качестве кормовых растений для телят, овец, лошадей и крупного рогатого скота используются серпуха чертополоховая, эруколистная [99, 100], а серпуха красильная в вареном виде как корм для дойных коров [99].

Серпуха венценосная является прекрасным стабильным позднелетним медоносом. В Сибири производство меда может достигать высокого уровня, при этом непрерывный рост приводит к урожайности 80-100 кг с гектара.

Мед, производимый в этом регионе, имеет характерный золотисто-зеленый цвет и характеризуется восхитительным ароматом и приятным вкусом. [101].

Широкий перечень терапевтических показаний, при которых отмечается положительное воздействие отваров и настоек серпухи, а также практически полное отсутствие побочных эффектов послужили стимулом для углубленных научных исследований.

Целенаправленное научное изучение фармакологических свойств серпухи венценосной стало проводиться после обнаружения в растениях данного рода фитоэкдистероидов и установления их физиологической активности, прежде всего анаболической [102-104], противоязвенной [105], гипогликемической [106], противовоспалительной [107], кардио- и гепатопротекторной [108, 109].

Экдистероиды играют решающую роль в жизненных процессах различных организмов, относящихся к разным классам. Они выполняют множество функций и имеют широкий спектр терапевтических показаний. Отвары, экстракты и настои, полученные из венценосного серпа, показали положительный эффект при лечении самых разнообразных заболеваний. Препараты, содержащие экдистероиды, способствуют регуляции минерального, углеводного, липидного и белкового обмена, а также обладают антиоксидантными и антирадикальными свойствами [110, 111].

Было обнаружено, что препараты, содержащие экдистероиды, нормализуют уровень глюкозы в крови, что делает их полезными при лечении сахарного диабета. Они также обладают свойствами, снижающими уровень холестерина, и могут помочь облегчить воспаление печени при токсическом гепатите. Кроме того, эти препараты имитируют действие витамина D и демонстрируют антирахитический эффект, помогая в профилактике и лечении рахита. [113].

Экдистероиды используются в современных высокотехнологичных технологиях в качестве естественных и безопасных лигандов в системах переключения молекулярных генов, в частности в системах экспрессии генов, индуцированных экдизоном. Эти системы полагаются на экдистероиды для регуляции экспрессии генов и управления специфическими биологическими процессами целенаправленным и точным образом [114, 115], в разработке селективных и экологически чистых инсектицидов [116, 117, 118, 119, 126].

Вместе с тем, выявленные в настоящее время новые направления использования фитоэкдистероидов (физическая культура и спорт, биотехнология, геновая инженерия, сельское хозяйство и т.д.) показывают, что потенциал их биологической активности еще до конца не раскрыт [109, 120, 121, 122, 123].

Приведенные в литературе данные свидетельствуют о том, что фитоэкдистероиды серпухи венценосной обладают широким спектром биологической активности. Показаны перспективы их использования в составе лекарственных средств адаптогенного, кардиотропного,

антисклеротического, противоязвенного, ранозаживляющего и антимикробного действия [110, 124, 125, 126, 127].

Исследования, проведенные в Лаборатории фармакологии кровообращения Научно-исследовательского института фармакологии Российской академии медицинских наук в Томске, показали, что 40%-ный водно-спиртовой экстракт серпухи венценосной обладает рядом полезных свойств. Экстракт продемонстрировал гемореологические эффекты, эффективно влияя на вязкость крови, агрегацию эритроцитов и деформируемость. Кроме того, он проявлял антирадикальную, антиоксидантную и антистрессовую активность и значительно подавлял процесс нейрогенного изъязвления. Эти результаты подчеркивают потенциальную терапевтическую пользу экстракта при лечении различных состояний, связанных с кровообращением и окислительным стрессом [85, 108, 110, 128, 129].

Исследование фармакологической активности экстрактов из надземной части серпухи венценосной в опытах на мышах с асцитной опухолью Эрлиха выявило способность экстрактов, приготовленных на 40- и 70-градусном этаноле, увеличивать эффективность химиотерапии — действие циклофосфана. Кроме того, 40% этанольный экстракт в дозах 1 и 5 мл/кг вызывал торможение роста опухоли у мышей-самок и не оказывал влияния на развитие опухолевого процесса у мышей-самцов [128].

Адаптогенные свойства экистероидсодержащей фракции коронованного серпуховского, основным компонентом которой является 20-гидроэкизон, были оценены с использованием методов биологического тестирования. Препарат проявлял высокую биологическую активность, что приводило к значительному повышению физической работоспособности на 63-107% и сокращению времени приблизительного исследовательского рефлекса на 40%. Установлено, что адаптогенный тонизирующий эффект экистероидной фракции из надземной части серпухи венценосной сопоставим с действием препарата "Экистен", который содержит 20Е, полученное из корневищ левзеи сафлоровидной. Эти результаты свидетельствуют о потенциале экистероидной фракции как эффективного адаптогена, обладающего свойствами, повышающими работоспособность. [81].

Инокостерон, выделенный из серпухи венценосной, обладает собственным выраженным анаболическим действием, что проявляется в усилении прироста массы тела у мышей вдвое по сравнению с контролем. Анаболическое действие инокостерона проявляется при определенной дозе (10 мг/кг) и сохраняется в течение не менее двух месяцев после курсового введения препарата. Оказалось, что существует возрастная и половая дифференциация величин анаболического эффекта инокостерона. Наиболее чувствительны к инокостерону молодые неполовозрелые животные, особенно молодые самки. У взрослых животных анаболический эффект также имеет место, но в значительно меньшей степени [130, 131].

Испытания показали, что субстанция из экидистероидов серпухи обладает выраженной эрготропной активностью (усиливает вдвое физическую выносливость у лабораторных мышей). При этом проявляет слабые анаболические свойства, которые можно явно обнаружить только у неполовозрелых животных [81]. На основании проведенных исследований и с учетом современных представлений о действии фитоэкидистероидов, можно считать, что основным действующим веществом в субстанции ES является 20-гидроксиэкидизон, придающий субстанции из серпухи свойства выраженного тонизирующего адаптогена. Соотношение компонентов 20-гидроксиэкидизон и 25-инокостерон в субстанции (80:11 %) из серпухи придает ей специфическое адаптогенное действие с мягким анаболическим эффектом [81].

В институте биологии Коми научного центра УрО РАН разработаны технологии получения кормовых добавок «Метаверон» и «Экидизон» [131].

Серпуха венценосная является перспективным сырьевым ресурсом для производства кормовых добавок, которые могут быть успешно использованы в промышленном производстве с целью улучшения суточных привесов и увеличения сохранности птицы [132].

Серпуха венценосная может использоваться в непереработанном виде как кормовая оздоровительная добавка для животных. Травяная мука из нее стимулирует репродуктивную функцию у коров, повышает надой и жирность молока, ускоряет среднесуточные приросты [133, 134].

Экидистероиды оказывают физиологическое воздействие на млекопитающих, стимулируя синтез белка, не вызывая гормональных побочных эффектов. Они влияют на пролиферацию клеток позвоночных, индуцируют дифференцировку кератиноцитов человека и повышают их трансклутаминазную активность, тем самым способствуя быстрому заживлению ран и трофических язв. Общеукрепляющие, адаптогенные и иммуномодулирующие свойства экидистероидов, продемонстрированные исследованиями на лабораторных животных, широко признаны [103, 120, 135, 136].

Инсектицидными свойствами против таких вредителей, как люцерновый слоник, паутинный клещ, хлопковая тля и карадрина, обладают экидистерон и витикостерон E, которые получают из согдийской серпухи и обладают гормоноподобной активностью при линьке. Результаты исследований подтвердили разнообразную биологическую активность витикостерона E, которая включает в себя действие пестицидов, анаболические свойства, профилактику экспериментального атеросклероза у кроликов и эстрогенную активность. Выделение витикостерона E из венценосного серпа выявило его значительный потенциал в различных областях, подчеркнув его многогранную роль в борьбе с вредителями, стимулировании роста животных, здоровье сердечно-сосудистой системы и гормональной модуляции. [8,137,138].

1.5 Качественные и количественные методы, проведенные на серпуху венценосную

Изучением различных видов рода серпуха занимались многие зарубежные ученые. Так ресурсоведческим исследованиям экидистероидсодержащего растения серпуха венценосная (*Serratula coronata* L.) посвятили свои работы Володина С.О., Бек С.А., Ревина Т.А., Чадин В.Ф.

Интродукция и промышленное возделывание *S. coronata* L. осуществлялись Тимофеевым Н.П., Хариной Т.Г., Бек С.А.

Анализ состава экидстероидов в дикорастущих и культивируемых растениях, а также динамики их накопления в вегетативных и генеративных органах серпухи венценосной (*S. coronata* L.), серпухи эруколистной (*S. xeranthemoides* Vieb.) и серпухи пятилистной (*S. quinquefolia* Vieb. ex Willd.) был проведен Велькиной Н.А., Володиным В.В., Ревинной Г.А., Уфимцевым К.Г., Зарембо Е.В., Одиноким В.Н., Холодовой Ю.Д. и др.

В результате научных изысканий зарубежными учеными в различных видах серпухи были выделены некоторые другие классы биологически активных соединений (БАС): Rolando A., Kubo I., Lamer-Zarawska E. (полисахариды); Wang S., Глызин В.И., Яцюк Я.К. (флавоноиды); Яцюк Я.К. (арбутин); Ткачев А.В. (эфирные масла); Алиева М.И. (аминокислотный состав); Кузьменко А.И. (витамин D₃, аргинин), Jtng Q.D. (глицерогликолипиды).

Для проведения химических исследований из образцов сырья получали в соответствии с общепринятыми методиками водные, 40% и 70% этанольные извлечения при нагревании. Для фармакологических исследований получали 40% этанольный экстракт методом реперколяции. После удаления растворителя при пониженном давлении, экстракт досушивали в сушильном шкафу при температуре 35-40°C и использовали для исследований.

Качественный и количественный состав биологически активных комплексов, содержащихся в серпухе, исследовали с помощью общепринятых и специфичных химических методов анализа. [139, 140]

ГЛАВА 2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

2.1 Характеристика объекта исследования

В качестве объекта исследования использовали высушенные образцы надземной части серпухи венценосной *Serratula coronata* L. в северных регионах Казахстана, в Акмолинской области, окр. с. Ермаковка, ГНПП “Кокшетау”, Орманды булаксоке лесничество, урожай 2021 года. Следуя соответствующим инструкциям по правилам сбора и сушки лекарственных растений изначально проведена заготовка необходимого растительного сырья. Хранение сырья проводили согласно требованиям правил общей фармакопейной статьей. На качество растительного сырья большое влияние оказывает соблюдение определенных условий сбора урожая, правильная техника сбора и соответствующие методы сушки. В процессе сбора урожая важно учитывать морфологические характеристики лекарственных растений и избегать потенциального заражения близлежащими растениями. Кроме того, сроки сбора должны соответствовать оптимальному периоду накопления активного вещества в сырье, принимая во внимание конкретный календарный период для каждого растения. Тщательно учитывая эти факторы, можно эффективно сохранить и оптимизировать качество лекарственного растительного сырья.

2.2 Методы исследования

Фитохимические методы анализы:

1. Качественное определение биологически активных веществ серпухи венценосной методами тонкослойной и высокоэффективной жидкостной хроматографии.

2. Количественное определение действующих веществ серпухи венценосной методом УФ-спектрофотометрии.

ГЛАВА 3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЯ

3.1 Методы выделения БАВ из растительного сырья

Выделение биологически активных веществ (БАВ) проводили в Научно-исследовательском институте новых химических технологий ЕНУ им. Л.Н. Гумилева.

Экстракты получали методом перколяции – противоточной экстракции – в научных лабораториях используют перколяторы и экстракторы. Мы применили экстрактор Сокслета, при помощи которого можно проводить непрерывную экстракцию в течение нескольких суток.

Аппаратура и реактивы:

- Аппарат Сокслета;
- Колба круглодонная, V=250 мл;
- Нагревательный аппарат;
- Весы лабораторные с погрешностью не более 0,01 г.;
- Обратный холодильник;
- Хлороформ или метанол.

Получение экстракта с хлороформом на аппарате Сокслета.

Методика. 20 г измельченного сырья в порошок помещали в гильзу и ставили в резервуар. В круглодонную колбу наливали 200 мл экстрагента хлороформа. Включали нагревательный аппарат и подключили обратный холодильник. После 10 часового процесс экстракции отгоняли в роторном испарителе темно-зеленого экстракта и получили 10 грамма экстракта.

Получение экстракта с метанолом на аппарате Сокслета.

Методика. 20 г измельченного сырья в порошок помещали в гильзу и ставили в резервуар. В круглодонную колбу наливали 200 мл экстрагента метанола. После 8 часового процесс экстракции отгоняли в роторном испарителе коричневого экстракта и получили 20 грамма экстракта.

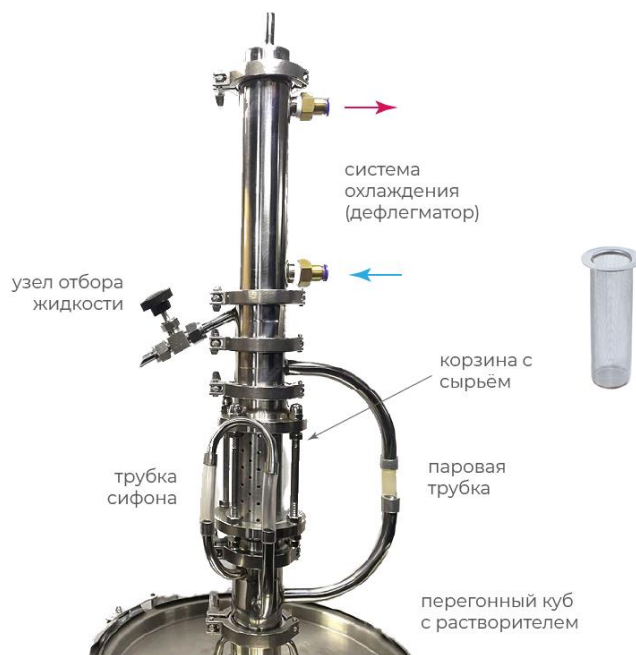


Рисунок 1 - Аппарат Сокслет

Экстрактор Сокслета – прибор непрерывной циклической экстракции. За счёт цикличности процесса сокращает время экстракции, по сравнению с настаиванием.

Конструкцию экстрактора позаимствовали из пищевого промышленного оборудования. Элементы повторяет лабораторный экстрактор с круглой колбой, который изобрел немецкий профессор земледельческой химии Высшего технического училища Франц фон Сокслет (нем. Franz von Soxhlet).

Преимущества экстрактора Сокслет:

сокращение срока получения экстракта;

повышение выхода ароматических соединений в сравнении с настаиванием;

экстракция холодным растворителем, в сравнении с «джин-корзиной».

Также экстракцию проводили 70% этанольным спиртом.

Важную роль для экстракции действующих веществ играет тип растворителя. Нами устанавливалась оптимальная концентрация этилового спирта для извлечения суммы фенольных соединений. Как следует максимальное извлечение экстрактивных веществ достигается 70% спиртом этиловым. Но, изучив спектральные характеристики извлечений, полученных с использованием спирта разной концентрации, пришли к выводу, что спирт этиловый 70% в данном виде сырья обладает наибольшей экстрагирующей способностью оксикоричных и фенолкарбоновых кислот.

Экстракция органическими растворителями (эфиром, хлороформом, дихлорэтаном, бензолом и т.д.) в нашем случае это - хлороформ. Для полного извлечения подбирают растворитель, обладающий хорошей растворяющей способностью по отношению к извлекаемым алкалоидам. Вместе с

алкалоидами в извлечение переходят сопутствующие вещества: жирные масла, смолы, хлорофилл и другие пигменты [141,142,143].

Для выделения кумаринов из растительного сырья обычно применяются различные растворители. Метиловый спирт позволяют извлекать как агликоны, так и гликозиды кумаринов.

3.2 Методы фитохимического исследования

В работе использованы методы: хроматографии в тонком слое сорбента, высокоэффективной жидкостной хроматографии, спектрофотометрии в ультрафиолетовых областях спектра.

Для проведения ТСХ–анализа применяли силикагелевые пластины «Sorbfil ПТСХ-АФ-В» 10x10см и «Sorbfil ПТСХ-АФ-В-УФ» 10x10см.

Хроматографический анализ выполняли в системе растворителей:

этилацетат–уксусная кислота–вода (5:1:1).

диметилхлорид - метанол - вода (4:3:2);

дихлорметан:метанол - вода (4:1:2);

дихлорметан:метанол: уксусная кислота (7:3:1);

дихлорметан – метанол - уксусная кислота (90:10:5);

ацетон: петролейный эфир в различных соотношениях;

этилацетат: гексан 2-30%.

Детектирование проводили в УФ-свете (при длинах волн 254 и 365 нм), до и после опрыскивания хроматограмм 2% спиртовым раствором хлорида алюминия.

Перед использованием пластины проходят подготовительную обработку. При необходимости пластины подвергают хроматографической промывке с использованием подходящего растворителя или их можно обработать элюированием, погружением или распылением соответствующего раствора. Другим способом приготовления пластин является активация в термостате, куда их помещают и подвергают воздействию температуры в диапазоне от 100°C до 105°C в течение одного часа. Эти подготовительные этапы обеспечивают оптимальное состояние и функциональность планшетов для эффективного хроматографического разделения.

ВЭЖХ–анализ проводили на хроматографе LC-20 Prominence (Shimadzu, Япония), колонка Supelco C18 (длина 25 см, внутренний диаметр 4,6 мм, зернение сорбента 10 мкм). Режим элюирования - изократический, в качестве подвижной фазы использовали смесь 1% раствора уксусной кислоты и ацетонитрила в соотношении 70:30, скорость потока 1 мл/мин. Детекцию осуществляли при аналитической длине волны $\lambda_{max} = 360$ нм.

В качестве стандартных образцов были использованы:

Гиперозид (quercetin-3-d-galactoside, hyperoside) – производства фирмы Fluka, представляющего собой кристаллический порошок с содержанием основного вещества не менее 97%;

Кверцетин (quercetin dihydrate) – производства фирмы Fluka, представляющего собой кристаллический порошок с содержанием основного вещества не менее 98%;

Рутин (quercetin-3-rutinoside trihydrate) – производства фирмы Fluka, представляющего собой кристаллический порошок с содержанием основного вещества не менее 95%;

Лютеолин (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone) – производства фирмы Fluka, представляющего собой кристаллический порошок с содержанием основного вещества не менее 99%;

Лютеолин-7-глюкозид (luteolin-7-glucoside) – производства фирмы Merck, представляющего собой кристаллический порошок с содержанием основного вещества не менее 97%.

УФ–спектры записывались на спектрофотометрах LAMBDA–25 (Perkin Elmer, США) и Evolution 220 (Thermo Scientific, США).

Измерения оптических плотностей исследуемых растворов проводили на спектрофотометрах «ПЭ–5300В (НПО «Экрос») и СФ-46.

Анализ флавоноидов.

Экстракцию проводили с использованием 70%-ного этанола, поскольку как 40%, так и 70%-ный этанол обладают одинаковой эффективностью при экстракции флавоноидных гликозидов. Было установлено, что двойной экстракции из сырья в течение 45 и 15 минут было достаточно, поскольку дальнейшие экстракции не приводили к увеличению содержания флавоноидов в экстракте.

Методика. Аналитическую пробу сырья измельчали до частиц такого размера, которые проходили через сито диаметром 1 мм, согласно ТУ 23.2.2068-89. Приблизительно 1,0 грамма измельченного сырья помещали в колбу емкостью 150 мл и добавляли 30 мл 70%-ного этанола. Затем колбу присоединяли к обратному холодильнику и нагревали на кипящей водяной бане в течение 45 минут с периодическим встряхиванием, чтобы обеспечить тщательное отмывание частиц сырья от стенок колбы. После охлаждения экстракцию отфильтровывали через бумажный фильтр в мерную колбу емкостью 100 мл. Процесс экстракции повторяли тем же методом еще в течение 15 минут. Вторую экстракцию также отфильтровывали через тот же фильтр в ту же мерную колбу, и фильтр промывали 70%-ным этанолом. Объем полученного фильтрата доводили этанолом до нужной отметки, в результате чего образовывался раствор А.

Объем 1 мл из раствора А переносили в мерную колбу вместимостью 25 мл. Затем в колбу добавляли 1 мл раствора хлорида алюминия в 95%-ном этаноле и 1 каплю уксусной кислоты. Объем раствора доводили 70%-ным этанолом до достижения нужной отметки, в результате чего образовывался раствор В. В качестве раствора сравнения использовали раствор, состоящий из 1мл раствора А, 1 капли уксусной кислоты, который доводили 70% спиртом этиловым до 25 мл.

Качественное исследование полученной фракции методом тонкослойной хроматографии на пластинках «Sorbfil» в системе этилацетат– уксусная

кислота–вода (5:1:1) показало, что это смесь трех флавоноидов, предположительно рутин, гиперозида и кверцетина, поскольку зоны веществ с желто-зеленой флуоресценцией после опрыскивания 124 хроматограммы 2% спиртовым раствором хлорида алюминия, совпадали по значениям Rf с такими же зонами на участках указанных образцов свидетелей. Для оценки количественного соотношения флавоноидов в полученной смеси мы провели исследование его состава методом ВЭЖХ. Достоверность идентификации пиков на хроматограммах подтверждали использованием в методике анализа соответствующих внутренних стандартных веществ – рутин, гиперозида и кверцетина. Подтверждено, что доминирующим флавоноидом в полученной смеси флавоноидов является рутин, составляя около 87% от их общего содержания, гиперозид составляет примерно 13% от общего содержания флавоноидов, кверцетин присутствует в следовых количествах. Таким образом, можно констатировать, что предложенным нами способом на основе водной экстракции листьев амаранта багряного была получена сумма флавоноидов – фактически технический рутин, с небольшим содержанием гиперозида и кверцетина.

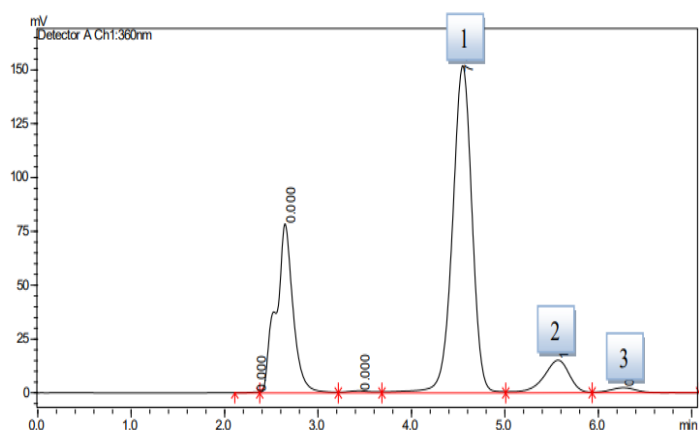


Рисунок 2 - Хроматограмма суммы флавоноидов из надземной части серпухи венценосной

Подвижная фаза: смесь 1% раствора уксусной кислоты и ацетонитрила в соотношении 70:30; стандартные образцы: 1 - рутин, 2 - гиперозид, 3 - кверцетин.

Анализ аскорбиновых кислот.

Полученную экстракцию осторожно наносили на пластину с помощью капиллярной трубки. Кроме того, в качестве эталона или контроля было нанесено пятно чистой аскорбиновой кислоты. Затем пластину с нанесенными образцами помещали в хроматографическую камеру, содержащую систему элюента или растворителя, состоящую из этилацетата и ледяной уксусной кислоты. (85:15);

проявитель – 0.2% спиртовый раствор 2,6-дихлорфенолиндофенолята натрия; оптимальный объем пробы – 2 мкл спиртового раствора с

содержанием АК 2 мг/мл; время насыщения камеры парами элюента – 20 мин;

время элюирования – 35 мин;

время выдерживания пластинки в термостате после проявления при $t \geq 80^\circ\text{C}$ – 3-5 минут.

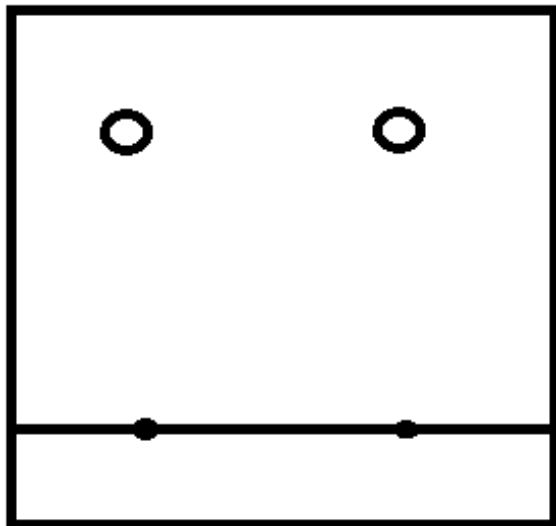


Рисунок - 3 Схема хроматограммы аскорбиновых кислот

Элюент: этилацетат-ледяная уксусная кислота (85:15)

Значение R_f : 0.54 ± 0.010 , длина волны: 247 Нм.

Каротиноиды.

К 5 мл исследуемого раствора добавляют 0,05 - 0,10 мл концентрированной серной кислоты. В результате становится видимым темно-синее окрашивание, свидетельствующее о присутствии каротиноидов.

Флуоресценция в УФ-лучах: спиртовой раствор фосфорно-молибденовой кислоты с нагреванием до температуры $60-80^\circ\text{C}$: каротиноиды обнаруживаются в виде синих пятен.

Кумарины. Для выявления кумаринов в растительном сырье могут быть использованы различные методы. Они включают оценку их лактоновых свойств, изучение их способности флуоресцировать в ультрафиолетовом свете, наблюдение за поведением при сублимации и получение окрашенных растворов при взаимодействии с диазосоединениями. Кроме того, для выделения и идентификации кумаринов в образце может быть использован хроматографический анализ.

Экстракция. 3г измельченного сырья в порошок пропускают через сито диаметром 3мм, затем помещают в колбу вместимостью 100мл. Добавляют 30мл 95% спирта, нагревают в колбе с обратным холодильником на кипящей водяной бане в течение 20 мин. и нагревают.

Разработка методики ТСХ для определения кумаринов. В литературе описано несколько систем растворителей для проведения ТСХ кумаринов:

1) циклогексан:этилацетат – 3:1; 2) толуол:этилформиат:муравьиная кислота –5:4:1; 3) хлороформ:уксусная кислота:вода – 4:1:1; 4) циклогексан:этилацетат:метанол – 12:14:1; 5) циклогексан:этилацетат:метанол – 3:2:1; 6) хлороформ:петролейный эфир – 1:2; 7) этилацетат:бензол – 1:2.

Система растворителя: хлороформ:метанол:вода – 60:35:7. Хроматографирование проводили в предварительно насыщенных камерах (время насыщения 30 мин.), на пластинках Сорбфил марки «ПТСХ-П-А-УФ» размером 100x100 мм. На следующем этапе исследований была предпринята попытка идентификации обнаруженных соединений флавоноидной природы с использованием в качестве «свидетелей» ГСО рутина, поскольку в литературе содержатся сведения о присутствии в исследуемом сырье серпухи этих флавоноидов.

Для обработки хроматограмм используют:

10% спиртовый раствор КОН,

диазотированный сульфаниламид - кумарины окрашиваются в оранжевый, красно-оранжевый или фиолетовый цвет,

пары йода - кумарины окрашиваются в коричневый цвет.

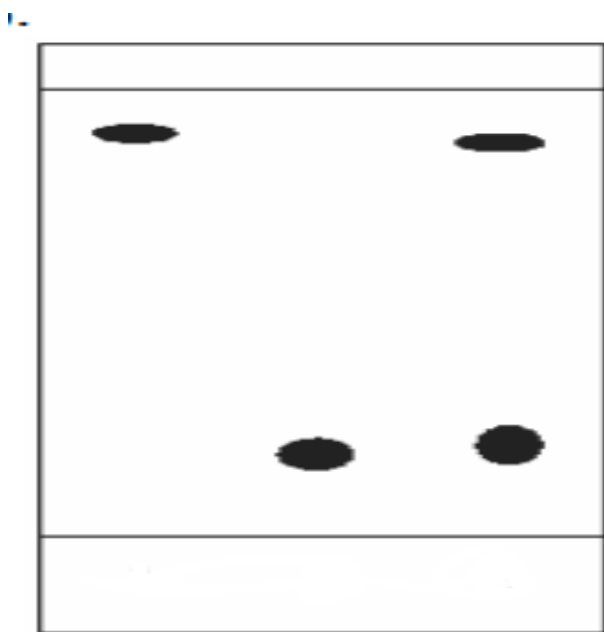


Рисунок 4 - Схема хроматограммы кумаринов

Кумарины на хроматограммах определяют по флуоресценции в УФ свете до и после проявления спиртовым раствором КОН.

Аминокислоты. Для качественного определения аминокислот в порошкообразном сырье серпухи венценосной, можно использовать процедуру, включающую использование 80%-ного этилового спирта. В частности, 100,0 г измельченного сырья заливают 80%-ным этиловым спиртом.

Экстракцию аминокислот из порошкообразного сырья венценосной

серпухи проводили путем добавления 80%-ного этилового спирта и выдерживания смеси на водяной бане при температуре 70°C в течение 1 часа. Затем полученную экстракцию фильтровали, промывали 80%-ным этиловым спиртом и подвергали выпариванию с повторной обработкой хлороформом. Слой воды, который, как ожидается, будет содержать аминокислоты, был отделен и дополнительно выпарен в условиях вакуума. Для проведения теста на нингидрин была проведена водная экстракция полученного образца.

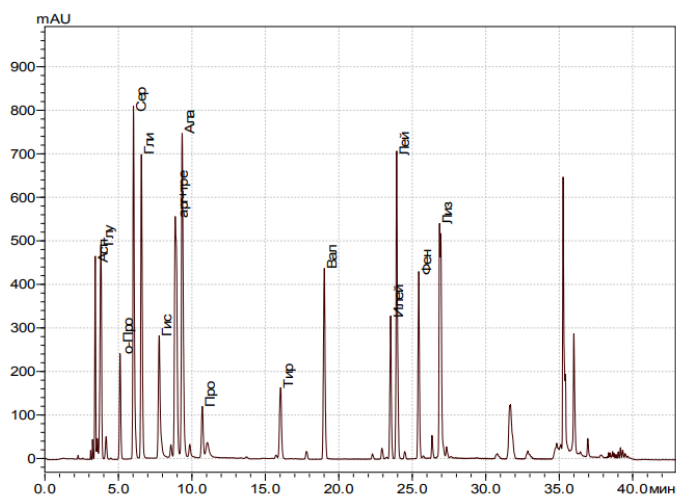


Рисунок 5 - Схема ВЭЖХ аминокислотного состава в надземной части серпухи венценосной

Эфирные масла. В большинстве случаев эфирные масла получают путем перегонки высушенных частей растений с водяным паром. Данный способ имеет ряд существенных недостатков:

- в процессе сушки растений могут происходить изменение химического состава эфирных масел;
- необходимая для процесса перегонки относительно высокая температура зачастую вызывает разложение душистых веществ, входящих в состав эфирного масла;
- хорошая растворимость некоторых душистых веществ в воде приводит к их потере, при ее конденсации из водяного пар;
- для некоторых труднолетучих душистых веществ температура перегонки бывает недостаточно высокой, что приводит к неполной отгонке и скудному составу полученного эфирного масла.

Основываясь на вышесказанном, был разработан собственный подход к выделению эфирных масел из высушенных образцов надземной части серпухи венценосной.

Таблица 4 - Хромато-масс-спектрометрия, выделенных эфирных соединений

Наименование соединения	Время удерживания, (мин)	Индекс удерживания Ковача, Ri		Порядок выхода/номер соединений на хроматограмме
		Найдено	Литературные данные [86]	
Цис-2-пентен-1-ол	4.955	756	-	(1)
Бутановая кислота	5.460	782	780	(2)
Цис-4-гексен-1-ол	6.610	842	862	(3)
Цис-2-гексен-1-ол	6.825	853	848	(4)
Гексилформиат	6.890	856	907	(5)
2-пентенил ацетат	7.715	899	897	(6)
Бензальдегид	8.895	960	927	(7)
Фенол	9.320	982	955	(8)
Гексановая кислота	9.455	989	973	(9)
4-Гексенил ацетат	9.680	1001	1006	(10)
Транс-4-гексеновая к-та	9.785	1006	1028	(11)
Гексилацетат	9.820	1008	1008	(12)
Цис-2-гексенил ацетат	9.865	1011	996	(13)
Транс-2-гексеновая к-та	10.360	1036	1042	(14)
Бензиловый спирт	10.425	1040	1005	(15)
Линалоол	11.655	1103	1082	(16)
β -фенилэтиловый спирт	12.010	1122	1083	(17)
Бензилацетат	12.905	1168	1149	(18)
3-этилфенол	13.035	1174	1142	(19)
Эпоксипиналол	13.175	1182	1136	(20)
<i>n</i> -цимен-8-ол	13.425	1195	1172	(21)
α -терпинеол	13.600	1204	1175	(22)
Кумаран	14.085	1230	1187	(23)
Бензотиазол	14.275	1241	1187	(24)
Гераниол	14.535	1255	1232	(25)
Фенэтилацетат	14.625	1260	1223	(26)
α -ионон	14.815	1271	1413	(27)
4-винилгвайякол	15.715	1321	1282	(28)
Нерилацетат	16.370	1358	1342	(29)
<i>n</i> -эвгенол	16.410	1361	1363	(30)
Геранилацетат	16.695	1377	1360	(31)

продолжение таблицы 4

Дамасценон	16.865	1387	1362	(32)
2-гидроксициннаминовая к-та	17.995	1457	-	(33)
Неролидол	19.675	1565	1548	(34)
3-гидрокси-β-дамасценон	20.520	1622	1627	(35)
Бисаболол оксид II	21.220	1671	1658	(36)
Можжевеловая камфора	21.345	1680	1681	(37)

Эфирное масло получили методом гидродистилляции на аппарате Клевенджера.

Аппаратура и реактивы:

- Аппарат Клевенджера;
- Колба круглодонная, V=2000 мл;
- Электроплитка;
- Водяная баня;
- Весы лабораторные с погрешностью не более 0,01 г.;
- Вода дистиллированная.

Методика:

1. Навеску измельченного сырья массой 80 г поместили в колбу для отгонки эфирного масла и залили 1 л дистиллированной воды. Колбу соединили с аппаратом Клевенджера и с боковой трубкой - приемника добавили воду и налили 1 мл гексана. Затем установили на электроплитку с водяной баней.

2. Эфирное масло отгоняли в течение 2-2,5 ч. Начало отгонки устанавливают с момента появления первых капель дистиллята. Интенсивность отгонки не должна превышать 45-50 капель в минуту.

3. За 10 мин до конца отгонки прекратили подачу воды в холодильник с целью прогрева его для того, чтобы оставшиеся на его внутренних стенках капли эфирного масла стекли в приемник.

4. После окончания отгонки объем масла в градуированной части приёмника определили после охлаждения его до комнатной температуры. Затем масло из приемника слили и через аппарат пропускали пар в течение 30 мин.

Результаты: Было получено эфирное масло, цвет: светло-желтый. Выход эфирного масла: 0,3538 грамм.

Идентификацию и количественный анализ суммы эфирных масел проводили с помощью газового хромато-масс-спектрометра SHIMADZU QR2010Plus, оснащенного капиллярной колонкой Supelco SLB-5ms 30m x 0.25mm x 0.25µm. Скорость потока газа-носителя (гелия) – 30 см/сек, деление потока 1:100. Температура инжектора составляла 250°C. Программирование температуры термостата колонки 34°C в течение 1 мин, затем со скоростью 8°C/мин до 250°C. Температура ионного источника – 200°C, энергия ионизации – 70эВ. Для всех компонентов смеси были

определены индексы удерживания Ковача [x\x].

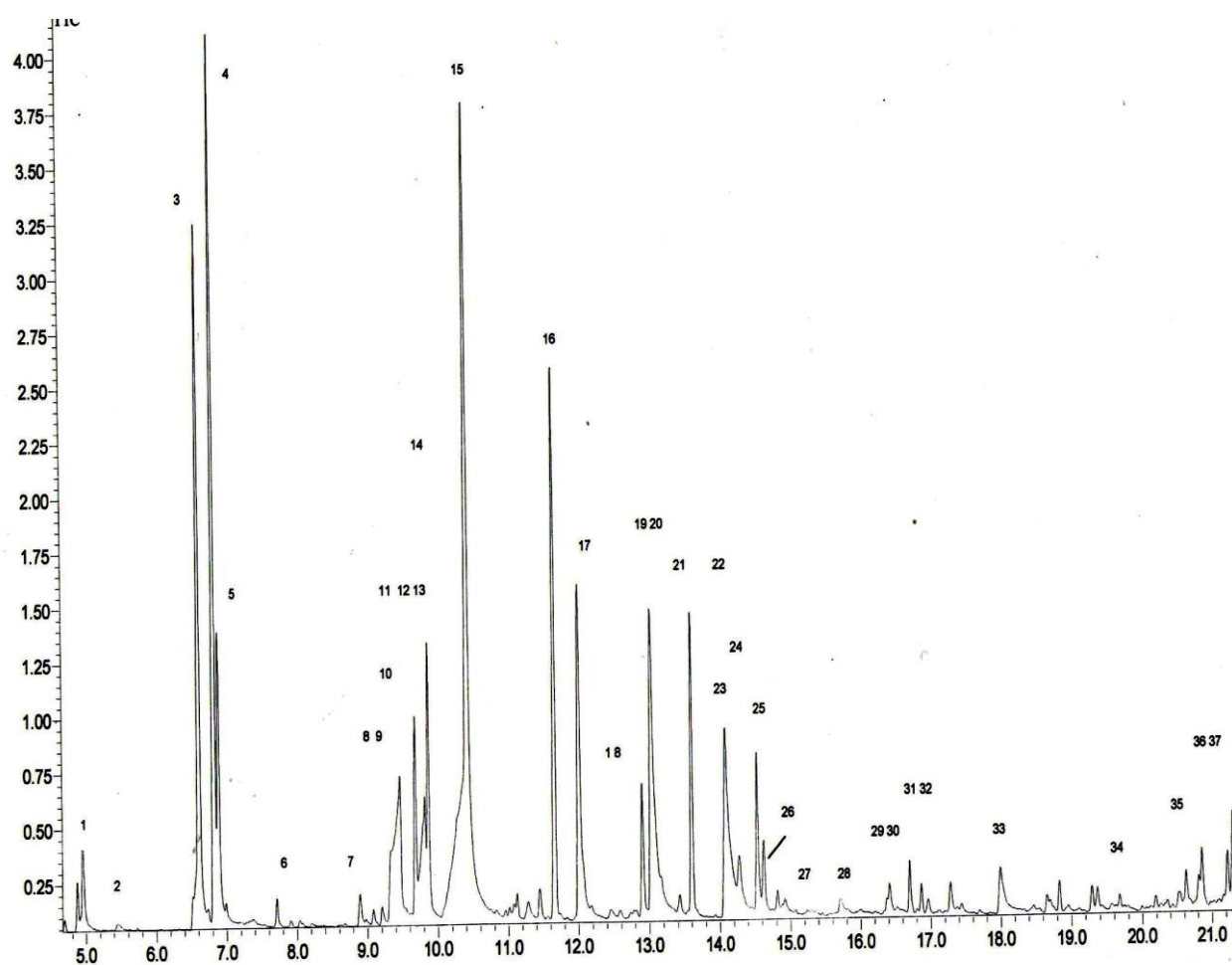


Рисунок 6 - Хромато-масс спектры выделенных эфирных соединений из серпухи венценосной

Изучение количественного состава эфирных соединений в серпухе венценосной. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Количественное содержание компонентов в эфирном масле.

№п/п	Наименование соединения	Относительное содержание в эфирном масле, %
1	Цис-2-пентен-1-ол	1,10
2	Бутановая кислота	0,14
3	Цис-4-гексен-1-ол	8,70
4	Цис-2-гексен-1-ол	9,90
5	Гексилформиат	3,30
6	2-пентенил ацетат	0,25

Продолжение таблицы 5

7	Бензальдегид	0,35
8	Фенол	1,30
9	Гексановая кислота	3,20
10	4-гексенил ацетат	2,00
11	Транс-4-гексеновая кислота	1,32
12	Гексилацетат	1,41
13	Цис-2-гексенил ацетат	2,80
14	Транс-2-гексеновая кислота	4,90
15	Бензиловый спирт	14,30
16	Линалоол	5,60
17	β -фенилэтиловый спирт	4,70
18	Бензилацетат	1,50
19	3-этилфенол	6,20
20	Эпоксипиналол	0,41
21	<i>n</i> -цимен-8-ол	0,20
22	α -терпинеол	3,20
23	Кумаран	4,70
24	Бензотиазол	1,10
25	Гераниол	1,70
26	Фенэтилацетат	0,80
27	α -ионон	0,21
28	4-винилгвайякол	0,20
29	Нерилацетат	0,11
30	<i>n</i> -эвгенол	0,32
31	Геранилацетат	0,50
32	Дамасценон	0,30
33	2- гидроксициннаминовая к-та	0,80
34	Неролидол	0,11
35	3-гидрокси- β - дамасценон	0,10
36	Бисаболол оксид II	0,50
37	Можжевельная камфора, 7(11)-селинен-4 α -ол	0,90

В результате проведенного исследования было идентифицировано 37 органических соединений, относящиеся к классам ароматических соединений, ациклических и циклических терпеноидов, ненасыщенных спиртов и карбоновых кислот.

Количественное определение групп БАВ в серпухе венценосной

Количественное определение идентифицированных групп природных соединений, таких как флавоноиды, кумарины и эфирные масла, проводилось с использованием фармакопейных методов, за исключением методов количественного определения содержания флавоноидов. Для количественной оценки флавоноидов предварительно определяли длину волны (λ_{max}) с наибольшим значением оптической плотности тестируемых экстрактов с помощью спектрофотометрического анализа.

Количественное определение флавоноидов в растительном сырье проводили с использованием следующей процедуры: приблизительно 1 г (точный вес) измельченного сырья помещают в колбу емкостью 150 мл с последующим добавлением 30 мл 70%-ного спирта. Затем колбу подсоединяют к обратному клапану и подвергают нагреванию на кипящей водяной бане в течение 30 минут. Затем колбу охлаждают до комнатной температуры с помощью струи холодной воды и смесь фильтруют через бумажный фильтр в мерную колбу емкостью 100 мл. Процесс экстракции повторяют еще два раза с использованием вышеупомянутого метода. Собранные экстракты затем снова фильтруют через тот же фильтр в ту же мерную колбу, при этом фильтр промывают 70%-ным спиртом. Наконец, объем полученного фильтрата доводят до метки тем же спиртом, в результате чего получается раствор А.

В мерной колбе емкостью 25 мл 4 мл раствора А соединяют с 2 мл 2%-ного раствора хлорида алюминия в 95%-ном спирте. Затем объем полученной смеси доводят 95%-ным спиртом до отметки на колбе. После периода ожидания в 20 минут измеряют оптическую плотность раствора при длине волны 385 нм с помощью спектрофотометра. Измерения проводятся в кювете с толщиной слоя 10 мм. Для целей сравнения готовят эталонный раствор путем смешивания 4 мл раствора А с 1 каплей разбавленной соляной кислоты в мерной колбе емкостью 25 мл. Затем объем раствора доводят 95%-ным спиртом до достижения отметки на колбе.

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

$$X = \frac{D \cdot 100 \cdot 100 \cdot 25}{330 \cdot m \cdot (100 - \omega)} \quad (1)$$

Где:

D- плотность испытуемого раствора; 330 - удельный показатель поглощения комплекса авикулярина с алюминия хлоридом при 410 нм; m - масса сырья в граммах; ω - потеря в массе при высушивании сырья в процентах.

Сумму фенольных соединений определяли перманганатометрическим методом, предлагаемым ГФ РК, для определения дубильных веществ в растительном сырье. Однако известно, что калия перманганат, окисляет все фенольные соединения, а также другие природные вещества. Поэтому при

использовании данной методики в результате получаем сумму всех окисляемых веществ данного сырья. Содержание их в надземной части серпухи венценосной составило $5,82 \pm 0,72\%$ (табл.6).

Гидроксикоричные кислоты определяли методом прямого спектрофотометрирования 70% этанольного извлечения из сырья при длине волны 325нм. Содержание суммы гидроксикоричных кислот в пересчете на кофейную кислоту находилось в пределах $0,17 \pm 0,07\%$.

Флавоноиды. Количественное определение флавоноидов в надземной части серпухи венценосной проводили спектрофотометрическим методом. Данная методика основана на способности флавоноидов образовывать окрашенный комплекс с этанольным раствором алюминия хлорида, который вызывает батохромный сдвиг длинноволновой полосы поглощения и при этом дает основной максимум поглощения при длине волны 415нм. Аналогичный максимум поглощения при длине волны 415 нм отмечен для комплекса ГСО рутина использованного нами в методике в качестве стандартного образца. Содержание флавоноидов в надземной части серпухи венценосной $5,34 \pm 0,26\%$.

Таблица 6 - Результаты количественного определения БАВ в надземной части серпухи венценосной.

№	БАВ	Содержание % от массы абс.- сух. сырья
1	Фенольные соединения, в том числе: -флавоноиды; -гидроксикоричные кислоты; -кумарины	$5,82 \pm 0,72$; $5,34 \pm 0,26$; $0,17 \pm 0,07$; $0,317 \pm 0,01$
2	Полисахариды, в том числе: -водорастворимые; -пектиновые вещества	$5,62 \pm 0,25$; $2,43 \pm 0,10$; $0,48 \pm 0,02$
3	Аминокислоты	$6,13 \pm 0,29$
4	Каротиноиды, мг%	$13,50 \pm 5,61$
5	Хлорофилл, мг%	$0,49 \pm 0,23$
6	Витамин К, мг%	$0,38 \pm 0,17$
7	Витамин С, мг%	$1,90 \pm 0,86$

Кумарины. Для количественного определения суммы кумаринов применяли метод прямого спектрофотометрирования при длине волны 353нм.

Полисахариды. Полисахаридов осаждали из сгущенных извлечений двукратным объемом 95% этанола. Осадки центрифугировали, высушивали в

сушильном шкафу взвешивали (таблица 7). (Gle-глюкоза, Ara-арабиноза, Gal-галактоза).

Таблица 7 - Количественный состав полисахаридов, выделенный из экстракта

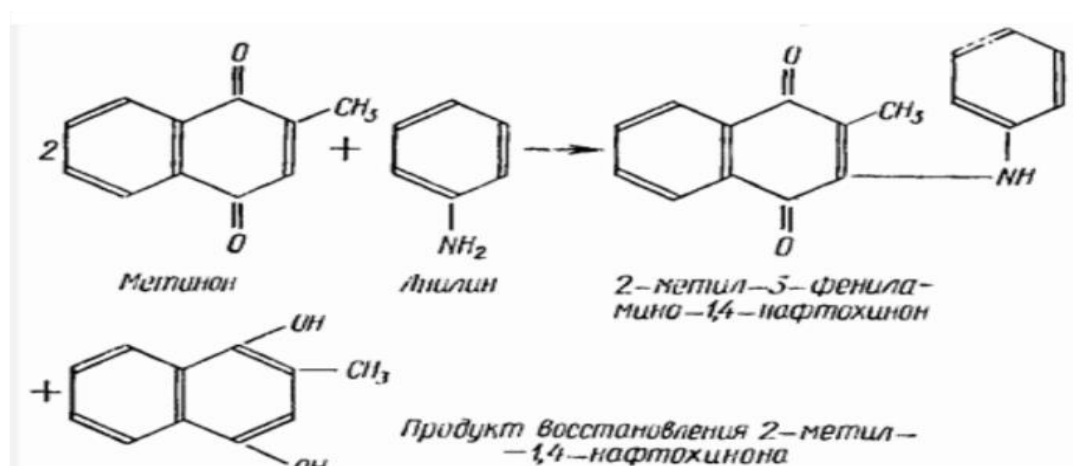
Тип полисахарида (ПС)	Выход ПС, % от абс.- сух. сырья	Содержание в ПС, %		Качественный состав ПС
		Сахаров	В том числе свободных сахаров	
Водорастворимые полисахариды (ВРПС)	2,55	9,5±0,48	3,2±0,16	Gle, Ara
Пектиновые вещества (ПВ)	0,41	11,75±0,59	8,4±0,42	Gal, Ara

Для определения моносахаридного состава фракций полисахаридов проводили их полный кислотный гидролиз 10% серной кислотой. Гидролизат количественного переносили в мерную колбу вместимостью 25мл и использовали для количественного анализа фракций.

Во фракция полисахаридов спектрофотометрическим методом определяли содержание свободных и связанных сахаров, образующихся после кислотного гидролиза. Для этого использовали способность сахаров давать окрашенные комплексы с пикриновой кислотой в щелочной среде. Оптическую плотность продукта измеряли на спектрофотометре СФ-46 при длине волны 470нм. Параллельно измеряли оптическую плотность стандартного раствора глюкозы, приготовленного аналогичным способом.

Были идентифицированы такие как: глюкоза, галактоза, арабиноза.

Витамин К. Количественное определение витамина К проводили спектрофотометрическим методом при длине волны 650 нм после реакции с раствором 2,6- дихлорфенолинфенолята натрия. Для определения содержания вит К использовали калибровочный график, построенный по раствору метинона.



Методика. 2,0 измельченного в порошок сырья экстрагировали ацетоном, порциями по 10 мл при интенсивном помешивании без нагревания. Экстракт собирали в мерную колбу вместимостью 50 мл. Объем доводили до метки и перемешивали (раствор А).

В мерную колбу вместимостью 25 мл помещали 5 мл раствора А, прибавляли 1 мл 1% этального раствора калия гидроксида, 0,3 мл раствора 2,6-ДХФИФ и доводили полученный окрашенный раствор ацетоном до метки (раствор Б).

Оптическую плотность раствора Б измеряли на спектрофотометре СФ 46 при длине волны 650 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали раствор В.

Содержание витамина К в пересчете на абсолютно сухое сырье в процентах (Х) определяли по калибровочному графику, построенному по раствору метинона с 2,6-ДХФИФ и вычисляли по формуле:

$$X = \frac{C \times V \times V3 \times 100 \times 100}{m \times V2 \times (100 - W)} \quad (2)$$

Где:

С - Количество витамина К, найденное калибровочному графику, г/мл;

V1 - объем раствора А, мл;

V2 - аликвота из раствора А, мл;

V3 - объем раствора Б, мл;

m - масса сырья, г;

W - потеря массы при высушивании сырья, %.

Приготовления раствора сравнения. В мерную колбу вместимостью 10 мл помещали 5 мл раствора А, 1 мл 1% этанольного раствора калия гидроксида и доводили ацетоном до метки (раствор В). Раствор использовали свежеприготовленным.

Хлорофилл. Количественное определение содержания хлорофилла проводили спектрофотометрическим методом. Приблизительно 1,0 г измельченного сырья помещали в колбу емкостью 150 мл и добавляли 30 мл 80%-ного этанола. Колбу подсоединяли к конденсатору и нагревали на

кипящей водяной бане в течение 30 минут. После охлаждения экстракцию отфильтровывали через бумажный фильтр в мерную колбу емкостью 100 мл. Этот процесс экстракции повторили еще два раза, используя тот же метод. Отфильтрованные экстракты объединяли в мерной колбе и промывали фильтр. Объем полученного раствора доводили до нужной отметки с использованием 80%-ного этанола. Оптическую плотность раствора измеряли при длине волны 660 нм с помощью спектрофотометра SF-46. Для сравнения использовали раствор 80%-ного этанола. Содержание хлорофилла определяли по формуле:

$$X = \frac{D \times V \times 100 \times 100 \times 100\%}{m \times 944,5 \times (100 - W) \times 100} \quad (3)$$

Где:

D- оптическая плотность исследуемого раствора;

V - объем исследуемого раствора, мл;

m - масса точной навески сырья, г;

W - влажность сырья, %;

944.5- E, удельный показатель поглощения хлорофилла при длине 660 нм.

Аскорбиновая кислота. Количественное определение аскорбиновой кислоты проводили титриметрическим методом. Метод основан на способности аскорбиновой кислоты восстанавливать 2,6- дихлордефенолят натрия.

Каротиноиды. Для извлечения каротиноидов проводили предварительное омыление сырья, а затем обрабатывали гексаном. Выделение каротиноидов проводили спектрофотометрическим методом при длине волны 440нм показало, что содержание каротиноидов в надземной части серпухи венценосной составляет 130 мг%.

Аминокислоты. Количественное определение аминокислот определяли спектрофотометрическим методом при длине волны 570 нм. Для этого использовали окрашенный продукт реакции водного извлечения со свежеприготовленным 0,2%-ным этанольным раствором нингидрина.

Таким образом, полученные данные по количественному содержанию основных групп биологически активных веществ, пришли к заключению, что наиболее значимыми из них являются флавоноиды, которые по данным фармакологического исследования, могут обуславливать антиоксидантные свойства данного растения.

Также в ходе работы дополнительно определили в серпухе венценосной: антиоксидантную активность, антирадикальную активность, цитотоксичность.

Определение антиоксидантной активности

Методика определения антиоксидантной активности: по методу FRAP

К 0,1 мл исследуемых веществ в диапазоне концентраций 0,25; 0,5; 0,75; 1,0 мг/мл добавляется 0,25 мл 0,2 М фосфатного буфера (pH=6,6) и 0,25 мл 1% раствора гексацианоферрата (III) калия. Реакционная смесь инкубируется в течение 20 мин. при 50⁰С, реакция останавливается добавлением 0,25 мл 10% раствора трихлоруксусной кислоты. Смесь центрифугируют 10 мин. (3000 обор./мин.). Верхний слой объемом 0,5 мл смешивается с 0,5 мл дистиллированной воды и 0,1 мл 0,1% FeCl₃. Измерение оптической плотности производится при 700 нм. Антиоксидантную активность (АОА) образцов сравнивали с АОА галловой кислоты.

Разведение производили из расчета 1мг вещества на 1мл растворителя. Каждый образец испытывали в трех параллельных опытах. Проводили при температуре 20±2⁰С, естественном световом периоде.

Результаты и их обсуждение

Метод FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power assay) основан на восстановлении антиоксидантами ионов Fe³⁺ до Fe²⁺, используется реакция восстановления антиоксидантами K₃[Fe(CN)₆] и сопровождается образованием окрашенного в жёлтый цвет K₄[Fe(CN)₆]. Измерения основаны на способности антиоксидантов подавлять окислительный эффект реакционных частиц, генерируемых в реакционной смеси. В качестве препарата сравнения использовали галловую кислоту. Образцы проверяли с концентрациями 0,25; 0,5; 0,75 и 1 мг/мл.

Таблица 8 - Изменение ОП растворов в зависимости от концентрации рабочих растворов

№	Образцы	Величина оптической плотности при концентрации (мг/мл)			
		0,25	0,5	0,75	1,0
1	Галловая кислота (ГК)	1,2259	1,3342	1,3456	1,3422
2	Эфирное масло надземной части <i>Serratula coronata</i> L. (Scor-0)	0,1689	0,1791	0,1856	0,4031
3	Хлороформный экстракт <i>Serratula coronata</i> L. (Scor-1)	0,4386	0,4560	0,5986	0,7486
4	Метанольный экстракт <i>Serratula coronata</i> L. (Scor-2)	0,2097	0,2682	0,3346	0,4883

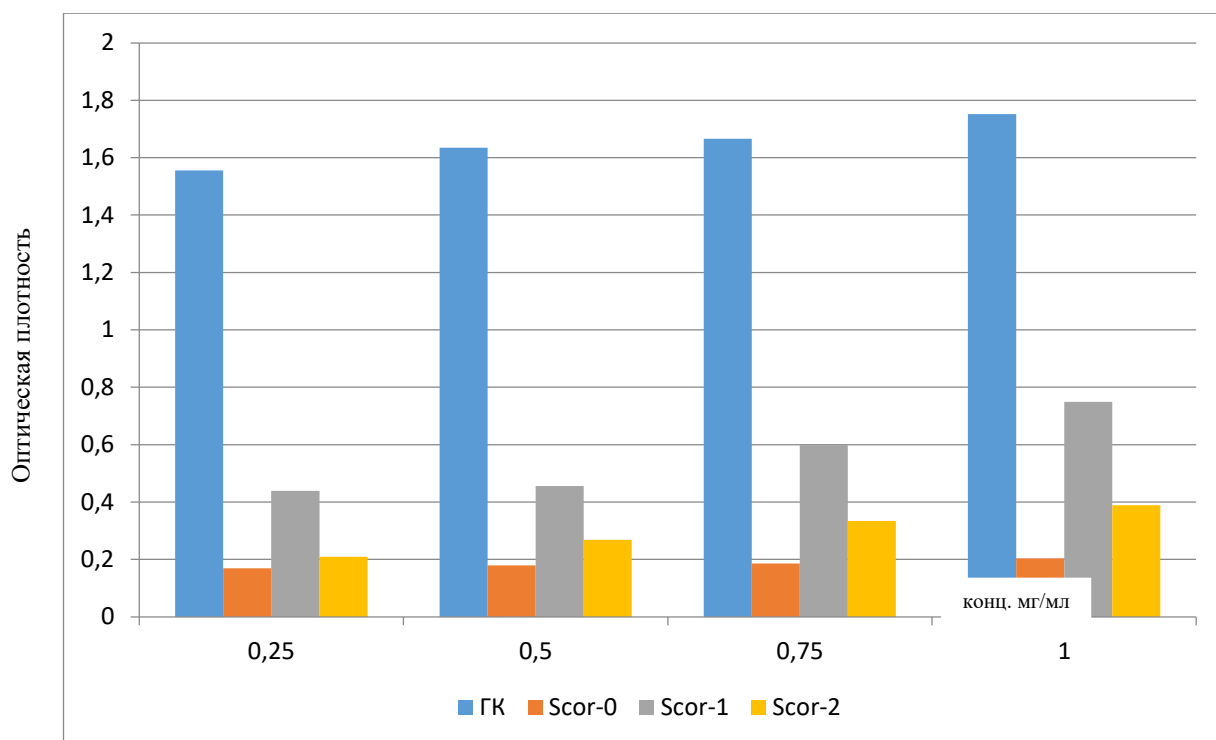


Рисунок 7 - Влияние концентрации веществ на изменение антиоксидантной активности

На основании анализа данных табл.1 и графика видно, что эфирное масло (Scor-0), хлороформный экстракт (Scor-1) и метанольный экстракт (Scor-2) надземной части *Serratula coronata* L. во всех концентрациях имеют высокую антиоксидантную активность по сравнению с АОА галловой кислоты.

Определение цитотоксичности

Для определения цитотоксической активности были взяты морские рачки *Artemia salina*. Эта методика основана на установлении различия между количеством погибших личинок артемий в анализируемой пробе (опыт) и воде, которая не содержит токсических веществ (контроль). Критерием острой летальной токсичности раствора вещества является гибель 50% личинок и более в опыте по сравнению с контролем.

Разведение производили из расчета 1мг вещества на 1мл растворителя. Каждый образец испытывали в трех параллельных опытах. Проводили при температуре $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, естественном световом периоде. Соленность контрольной искусственной воды равна 8,0-8,5 (рН). Во время биотестирования личинки артемий были в возрасте до 1 суток. Плотность посадки личинок – 20-40 экземпляров на одну пробирку.

Результаты и их обсуждение

Цитотоксическая активность. Изучали цитотоксическую активность методом выживаемости морских рачков *Artemia salina*. Колбу заполняли искусственной морской водой и добавляли яйца *Artemia salina*. Выдерживали в течение 3-х дней при мягкой подаче воздуха пока рачки не вывелись из яиц. В качестве препарата сравнения использовали Актиномицин Д. Образцы проверяли с концентрациями 10, 5 и 1 мг/мл. Результаты исследований цитотоксической активности показаны в таблице 9.

Таблица 9 - Результаты исследования цитотоксической активности

Исследуемые вещества	Концентрации, мг/мл	К-во личинок в контроле		К-во личинок в образце			% выживших личинок в контроле	% выживших личинок в образце	Смертность, А,%	Наличие нейротоксичности, %
		выж.	погиб	выж.	погиб.	пар.				
Актиномицин Д	10	27	1	0	22	0	96	0	96	0
	5	27	1	1	25	0	96	4	92	0
	1	27	1	9	18	0	96	33	63	0
Scor-0	10	27	1	0	27	0	96	0	96	0
	5	27	1	0	30	0	96	0	96	0
	1	27	1	0	27	0	96	0	96	0
Scor-1	10	27	1	23	1	0	96	96	0	0
	5	27	1	26	1	0	96	96	0	0
	1	27	1	27	0	0	96	96	0	0
Scor-2	10	27	1	23	1	0	96	96	0	0
	5	27	1	28	1	0	96	96	0	0
	1	27	1	30	1	0	96	96	0	0

В результате исследования цитотоксической активности установлено, следующее:

- эфирное масло надземной части *Serratula coronata* L. (Scor-0) проявляет цитотоксичность, все личинки погибают, смертность личинок составляет 96%.

- хлороформный (Scor-1) и метанольный (Scor-2) экстракты надземной части *Serratula coronata* L. не проявляет цитотоксичность.

Препарат сравнения Актиномицин Д по отношению морских рачков *Artemia salina* во всех концентрациях проявляет цитотоксичность – смертность личинок составляет 63-96%.

Определение антирадикальной активности.

Методика определения антирадикальной активности. Для определения ингибирования 2,2-дифенил-1-пикрилгидразилрадикала (DPPH) к 0,1 мл спиртового раствора исследуемых растворов в диапазоне концентраций 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 и 1,0 мг/мл добавляли 3 мл $6 \cdot 10^{-5}$ М раствора радикала. Пробирки находились в штативе, завернутого в черный полиэтилен. После интенсивного перемешивания растворы оставались в темноте на 30 минут, далее измеряли оптические плотности при 520 нм. Значения величины антирадикальной активности (АРА) исследуемых объектов определяли по формуле:

$$ARA (\%) = A_0 - A_t / A_0 * 100,$$

где A_0 – оптическая плотность контрольного образца; A_t – оптическая плотность рабочего образца.

Результаты и их обсуждение

Оптическую плотность исследуемых растворов зависящую от концентрации измеряли на спектрофотометре при длине волны 520 нм. В качестве препарата сравнения использовали галловую кислоту. Образцы проверяли с концентрациями 0,1; 0,25; 0,5; 0,75 и 1 мг/мл.

Таблица 10 - Изменение оптической плотности исследуемых растворов с изменением концентрации

	Исследуемые вещества	Значения оптической плотности по концентрациям (мг/мл)				
		0,1	0,25	0,5	0,75	1,0
	Галловая кислота (ГК)	0,1644	0,1575	0,1336	0,1267	0,1192
	Эфирное масло <i>Serratula coronata</i> L. (Scor-0)	0,6507	0,6363	0,6332	0,6312	0,6311
	Экстракт <i>Serratula coronata</i> L. хлороформный (Scor-1)	0,6584	0,5719	0,5709	0,5585	0,5568
	Экстракт <i>Serratula coronata</i> L. метанольный (Scor-2)	0,6475	0,5607	0,5564	0,5534	0,4597

Антирадикальную активность исследуемых растворов сравнивали с антирадикальной активностью галловой кислоты (ГК). Значения исследуемых экстрактов антирадикального эффекта, рассчитанные по формуле, приведены в табл.11.

Таблица 11 - Антирадикальная активность (%) экстрактов при разных концентрациях

Исследуемые вещества	Концентрация экстрактов (мг/мл)				
	0,1	0,25	0,5	0,75	1,0
Галловая кислота (ГК)	80,88	81,69	84,47	85,27	86,14
Эфирное масло <i>Serratula coronata</i> L. (Scor-0)	33,29	34,76	35,16	35,28	35,29
Экстракт <i>Serratula coronata</i> L. хлороформный (Scor-1)	32,48	41,35	41,46	42,72	42,90
Экстракт <i>Serratula coronata</i> L. метанольный (Scor-2)	33,54	42,45	42,89	43,19	52,81

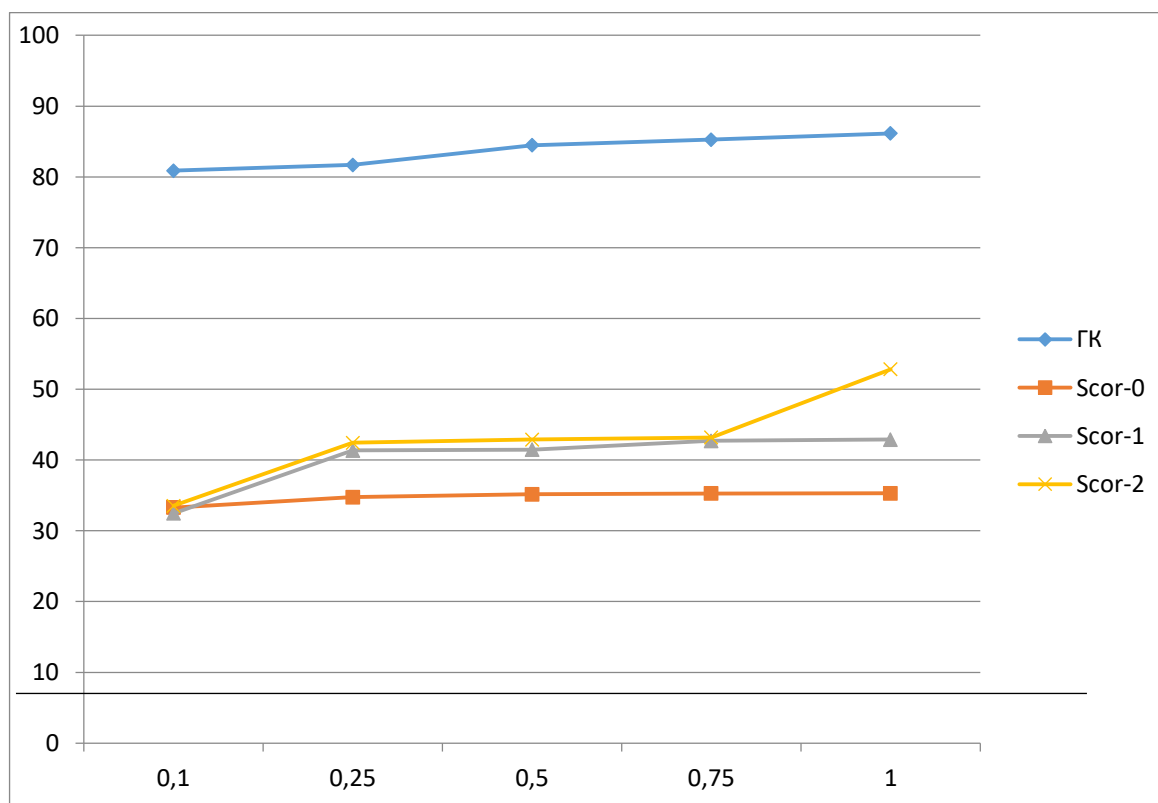


Рисунок 8 - Динамика антирадикальной активности при изменении концентрации веществ.

На основании анализа данных таблицы и графика видно, что эфирное масло надземной части *Serratula coronata* L. (Scor-0) во всех концентрациях имеет низкую антирадикальную активность по сравнению с антирадикальной активностью галловой кислоты.

Хлороформный (Scor-1) и метанольный (Scor-2) экстракты надземной части *Serratula coronata* L. имеют в концентраций 0,1 мг/мл низкую, а в концентрациях 0,25; 0,5; 0,75 и 1 мг/мл среднюю антирадикальную активность по сравнению с антирадикальной активностью галловой кислоты.

3.3 Статистические методы анализа

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью прикладной программы STATISTICA/w6 с использованием критерия Стьюдента в электронных таблицах Microsoft Excel.

ВЫВОДЫ

1. В результате проведенных исследований разработаны методики определения состава биологически активных веществ серпухи венценосной методами тонкослойной хроматографии (ТСХ) и высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ):

- методом ТСХ выбрана наиболее оптимальная подвижная фаза, в которой достигается селективное разделение активных компонентов с высокой чувствительностью и воспроизводимостью результатов определения. Определены пределы обнаружения биологически активных веществ в извлеченном экстракте. В качестве стандартного образца использованы рутин и кверцетин. В качестве детектирующих средств использован УФ-свет.

Разработанная методика качественного определения методом тонкослойной хроматографии показала высокую воспроизводимую и точность. Интенсивность пятен окраски и границы выражены четко.

- методом ВЭЖХ при длине волны 360 нм выбран наиболее оптимальный режим элюирования - изократический, подвижная фаза (смесь 1% раствора уксусной кислоты и ацетонитрила в соотношении 70:30), скорость потока составил 1 мл/мин. В качестве стандартного образца использованы гиперозид, кверцетин, рутин, лютеолин, лютеолин-7-гликозид.

Разработанная методика качественного определения методом высокоэффективной хроматографии дает возможность одновременного разделения нескольких образцов, использования многократного элюирования (при различных условиях), а также одновременного разделения компонентов одного и того же образца с помощью выбранного элюента.

2. Разработана методика количественного определения основных действующих веществ серпухи венценосной с использованием спектрофотометрического метода в УФ-области. По результатам исследований определена сумма основных действующих веществ серпухи венценосной: фенольные соединения (флавоноиды - 5,82%, кумарины - 0,317%), полисахариды 3,62%, аминокислоты 6,13%, каротиноиды, мг - 13,50 %, хлорофилл, мг - 0,49%, витамин К мг- 0,38%, витамин С мг - 1,90%.

Разработанная методика количественного определения с помощью УФ-спектрофотометрии позволяет при заданных концентрациях, толщине слоя непосредственно определить коэффициент пропускания. Дает достаточно надежные и воспроизводимые результаты.

Таким образом, найдены оптимальные хроматографические системы и условия их применения в ТСХ и ВЭЖХ. Выбранные подвижные фазы позволяют улучшить эффективность хроматографического процесса и форму хроматографических зон БАВ серпухи венценосной по сравнению с элюентами, предложенными авторами аналогичных работ. Результаты исследования количественного состава БАВ серпухи венценосной с помощью метода спектрофотометрии в УФ-области свидетельствуют о пригодности предложенной методики, отличающейся доступностью, быстротой, высокой воспроизводимостью, отсутствием высокотоксичных реактивов.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Борисова, А.Г. Флора СССР / А.Г. Борисова. - М.-Л. 1963 - Т.28,- 269с.
2. Адаптогенные свойства экстракта серпухи венценосной / И. Карилхан С.С. Альжанов, А.Г. Бердин и др. // Человек и лекарство. Тез. докл. X российского национального конгресса. - Москва, 2003. - С.719-720
3. Биологическая эффективность двух кормовых добавок, содержащих экдистероиды *Serratula coronata* L / В.Г. Заинулин, В.П. Мишуров, В.В. Пунегов и др. // Растительные ресурсы. - Вып.2. - 2003. - с. 95-103
4. Володин, В.В. Биологическая активность 20- гидроксоекдизона и его ацетатов / В.В. Володин, Т.И. Ширшова, С.А. Бурцева, М.В. Мельник // Растительные ресурсы. - М., 1999. - вып.2. - С.76-81
5. Bergamasko, R. The biological activities of ecdysteroids and ecdysteroid analogues / R. Bergamasko, D.H.S. Horn. // Developments in endocrinology. Progress in ecdysone research. Amsterdam, 1980. - Vol. 7. P. 299-324
6. Флора Сибири. Asteraceae (Compositae). / под ред. Красноборова И.М. - Н.: 1997.-Т.13.-472С.
7. Крылов, П.Н. Флора Западной Сибири / П.Н. Крылов. - Томск: изд-во ТГУ, 1949. - Т. XI. - 1934-2941 с.
8. Ганиев, Ш.Г. Содержание экдизонов в некоторых растениях родов *Serratula coronata* L. и *Rhaponticum LUDW* / Ш.Г. Ганиев // Растительные ресурсы, - том XVI, - вып.2, - 1980. - С. 193-198.
9. Интродукция растений природной флоры Сибири. / А.К. Скворцов, Н.В. Трулевич, З.Р. Алферова и др. // Справочник М."Наука" - 1979, - 431 с, - С. 82.
10. Харина, Т.Г. Методический подход к созданию высокопродуктивных интродукционных популяций (на примере серпухи венценосной) / Т.Г. Харина // Труды первой всероссийской конференции по ботаническому ресурсоведению. - СПб, 1996. С. 132.
11. Харина, Т.Г. Эколого-биологические особенности серпухи венценосной в связи с интродукцией в Западной Сибири: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Т.Г. Харина. - Новосибирск, 1990. - 16 с.
12. Харина, Т.Г. Возрастной состав ценопопуляций *Serratula coronata* L. на юге Томской области / Т.Г. Харина // Растительные ресурсы. - вып.3, - 1988, - С.362-367.
13. Ревина, Т.А. Серпуха венценосная как источник получения экдистерона / Т.А. Ревина, Т.Г. Харина, Т.Я. Тайлашева // Новые лекарственные препараты из растений Сибири и Дальнего Востока - тез. всесоюз. конф. Томск, 1986.-с. 125-126.
14. Insect hormones. The structure of ponasteron A, an insect-moulting hormone from the leaves of *Podocarpus nacaïi* Haj. / K. Nakanishi, M. Koreeda, S. Dasaki et al // J. Chem. Soc. Chem Commun. - 1966. - Vol. 24. - P. 915-917.
15. Galbraith, M.N. An insect-moulting hormone from a plant / M.N. Galbraith, D.H.S. Horn. / J. Chem. Soc. Chem. Commun. - 1966. - P.905-906

16. Яцюк Я.К. О выделении экистерона / Я.К. Яцюк, Г.М. Сегаль // Химия природных соединений. -1970. -№2. -С. 281
17. Эзау, К. Анатомия семенных растений: пер. с англ.: в 2 т. / К. Эзау. – М.: Мир, 1980.
18. Муравьева Д.А., Самылина И.А., Яковлев Г.П. Фармакогнозия.-М.: Медицина, 2002, 656 с.
19. Лекарственное растительное сырье. Фармакогнозия: Учебное пособие /под ред.Г.П.Яковлева и К.Ф.Блиновой/.-СПб.:СпецЛит, 2004.-765 с.
20. Абубакиров, Н.К. Экистероиды цветковых растений (Angiospermae) / Н.К.Абубакиров // Химия природ. соединений. – 1981. - №6. – С. 685-702.
21. Новосельская, И.Л. Фитоэкистероиды *Serratula coronata* L. / И.Л. Новосельская, М.Б. Горовиц, Н. К. Абубакиров // Химия природ. соединений. -1981. - №5. - С.668-669.
22. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейство Asteraceae (Compositae). - СПб.: Наука, 1993. - 352 с.
23. Абубакиров, Н.К. Гормоны линьки насекомых в растениях Средней Азии /Н.К. Абубакиров // Изв. АН КазССР. Сер. Хим. – 1984. - №4. – С. 49-53.
24. Сравнительный аминокислотный состав растений - продуцентов экистероидов / М.И. Алиева [и др.] // Химия раст. сырья. – 2001. - №1. – С. 63-68.
25. Новые экистероиды из *Serratula coronata* / Н.А. Велькина [и др.] //Актуальные проблемы органической химии: материалы молодежной науч. школа-конф. – Новосибирск, 2003. – С. 195.
26. Инокостерон и макистерон А из *Serratula coronata* L. / В.В. Володин [и др.] // Физиология растений. – 1998. – Т.45, №3. – С. 378-382.
27. Володина, С.О. Технология получения субстанции 20-гидроэкидизона из надземной части *Serratula coronata* L. / С.О. Володина, В.В. Володин // Поиск, разработка и внедрение новых лекарственных средств и организационных форм фармацевтической деятельности: материалы Междунар. науч. конф. – Томск, 2000. – С. 213.
28. Ганиев, Ш.Г. Содержание экидизонов в некоторых растениях родов *Serratula coronata* L. и *Rhaponticum* LUDW / Ш.Г. Ганиев // Раст. ресурсы. - 1980. - Т. 16, вып.2. - С. 193-198.
29. Гормональное, токсическое и адаптогенное влияние экистероидов *Serratula coronata* L. на личинок *Ephesia Kuhnella* Zell / К.Г. Уфимцев [и др.] // Раст. ресурсы. – 2002. – Т. 38, вып.2. – С. 29-39.
30. Лекарственные растения сибирской флоры как источники биологически активных соединений / Н.В. Доцинская [и др.] // Первая республиканская конференция по медицинской ботанике: тез. докл. - Киев, 1984. - С.121-122.

31. Зарембо, Е.В. Содержание 20-гидроксиэкдизона в видах родов *Rhaponticum* Ludw. и *Serratula* L. флоры Дальнего востока России / Е.В. Зарембо, Л.И. Соколова // Раст. ресурсы. - 2001. - Вып. 3. - С.59-64.
32. Новосельская, И.Л. Фитоэкдизоны *Serratula* / И.Л. Новосельская, М.Б. Горовиц, Н.К. Абубакиров // Химия природ. соединений. - 1975. - №3. - С.429-430.
33. Поиск экдизонсодержащих растений во флоре Западной Сибири / Г.А. Ревина [и др.] // Бюл. сиб. ботан. сада. - 1983. - Вып. 13. - С. 16-19.
34. Ревина, Г.А. Динамика содержания экдистерона в надземной части *Serratula coronata* L. и влияние на него света разного спектрального состава / Г.А. Ревина, Р.А. Карначук, Т.Я. Тайлашева // Раст. ресурсы. - 1986. - Вып.1. - С. 70- 72.
35. Ревина, Т.А. Экдистероидсодержащие виды во флоре Горного Алтая / Т.А. Ревина, А.С. Ревушкин, А.В. Ракитин // Раст. ресурсы. - 1988.-Вып. 4. - С. 565- 570.
36. Ресурсосберегающая кормовая добавка для цыплят-бройлеров с фитоэкдистероидами растения *Serratula coronata* L / В.В. Пунегов [и др.] // Внедрение ресурсосберегающих технологий в сельскохозяйственном производстве: материалы II науч.-практ. конф. – Новокузнецк, 2001. - С. 29-30.
37. Фитоэкдистероиды *Serratula coronata* и синтетические трансформации 20- гидроэксдизона / В.Н. Одинокоев [и др.] // Химия, технология и медицинские аспекты природных соединений: материалы Междунар. науч. конф., г. Алматы, 8-11 окт. 2003 г. - Алматы, 2003. - С. 136.
38. Фитоэкдистероиды дальневосточных видов рода *Serratula* L / Е.В. Зарембо [и др.] // Новые достижения в химии и химической технологии растительного сырья: материалы II Всероссийской конференции. - 21-22 апр. 2005г. - Барнаул. – Кн. 2. - 351с.
39. Харина, Т.Г. Эколого-биологические особенности серпухи венценосной в связи с интродукцией в Западной Сибири: автореф. дис. канд. биологических наук: 03.00.05/ Татьяна Георгиевна Харина. - Новосибирск, 1990. - 16 с.
40. Химическая модификация 20-гидроэксдизона и исследование мембранотропных свойств его производных / Н.К. Политова [и др.] // Химия раст. сырья. - 2001. - №2. - С .69-81.
41. Холодова, Ю.Д. Фитоэкдизоны - биологически активные полигидроксилированные стеринны / Ю.Д. Холодова // Укр. биохимич. журн.- 1979. - Т.51, № 5. -С. 560-575.
42. Чадин, И.Ф. Распределение 20-гидроэксдизона в генеративных растениях *Serratula coronata* L. / И.Ф. Чадин, Н.А. Колегова, В.В. Володин // Сибир. эко-логич. Журн. - 2003. -№1. - С.49-54.
43. Экдистероидная фракция надземной части *Serratula coronata* L. в реакции спонтанного E-розеткообразования и агармиграционном тесте *in vitro* / Д.С. Тренин [и др.] // Эксперим. и клинич. фармакология. - 1996. –Т.59, №1. -С. 55-57.

44. Яцюк, Я.К. О выделении экидистерона / Я.К. Яцюк, Г.М. Сегаль // Химия природ. соединений. -1970. -№2. -С. 281
45. Components of *Serratula* species; screening for ecdysteroid and inorganic constituents of some *Serratula* plants/ M. Bathori [et al.] // Acta Pharm Hung. - 1999. - Vol. 69, N2. - P. 72-76
46. Effect of vitamin D₃, arginine, and a biologically active complex from *Serratula coronata* on free radical oxidation of lipids in vitamin D deficiency / A.Y. Kuz'menko [et al.] // Ukr. Biokhim. Zh. - 1999. - №71 (2). - P.69-74.
47. Galyautdinov, I.V. Phytoecdysteroids from *Serratula coronata* L. juice. / I.V. Galyautdinov, N.A. Veskina, D.V. Nedopekin. // International conference on natural products: chemistry, technology & medicinal perspectives. - Almaty. 2003. - P.138.
48. Insect hormones in vertebrates: anabolic effects of 20-hydroxyecdysone in Japanese quail / K. Slama [et al.] // Experimentia. – 1996. - Vol.52, №7. - P. 702-706.
49. Odinokov, V.N. Isolation and identification of phytoecdysteroids from *Serratula coronata* L. juice and synthetic transformations of 20-hydroxyecdysone. / Odinokov V.N. // International conference on natural products: chemistry, technology & medicinal perspectives. - Almaty, 2003. - P. 162.
50. Volodin, V. Screening plants of European North-East Russia for ecdysteroids / V. Volodin, I.P. Chadin, L. Dinan // Biochem. Ecol. - 2002. - Vol. 30. - P.525-578.
51. Фитоэкидизоны *Serratula xeranthemoides*. / Холодова Ю.Д. [и др.] // Химия природ. соединений. – 1979. - № 2. –С. 171-174.
52. Глызин, В.И. 3-О-метилкверцетин из *Serratula inermis* / В.И. Глызин, А.И. Баньковский, Т.М. Мельникова // Химия природ. соединений. - 1972. - №3.- С.389-390
53. Яцюк, Я.К. Флавоноиды *Serratula inermis* / Я.К. Яцюк., С.С. Лященко // Химия природ. соединений. - 1969. -№1. -С.54.
54. Динамика содержания 20-гидроэкидизона в различных органах *Serratula manshurica* Kitag / Е.В. Зарембо [и др.] // Раст. ресурсы. - 2004. – Т. 40, вып. 3. - С. 65-72.
55. Ганиев, Ш.Г. Влияние экидизонсодержащих экстрактов из *Serratula sogdiana* Bunge и *Rhaponticum integrifolium* C. Winkl. на гусениц непарного шелко-пряда / Ш.Г. Ганиев // Раст. ресурсы. - 1987.-Вып.4. - С.634-636.
56. Зацны, И.А. Арбутин из *Serratula sogdiana* / И.А. Зацны, М.Б. Горовиц, Н.К. Абубакиров // Химия природ. соединений. - 1973. - №3.- С.437-438
57. Зацны, И.А. Фитоэкидизоны *Serratula*. Витикостерон Е из *Serratula sogdiana* и его частичный синтез / И.А. Зацны, М.Б. Горовиц, Н.К. Абубакиров // Химия природ. соединений. - 1973. - №2. - С. 175-178.

58. Яцюк, Я.К. О содержании арбутина в некоторых видах рода *Serratula* / Я.К. Яцюк, С.С. Лященко, В.С. Баткж // Химия природ. соединений. -1968. - №1. – С. 54.
59. Antioxidative and free radical scavenging effects of ecdysteroids from *Serratula strangulata* / Y-J. Cai [et al.] // Canadian J. of Physiology and Pharmacology. - 2002. - Vol. 80, N 12. - P. 1187-119.
60. Glyceroglycoipids from *Serratula strangulata* / Q.D. Jtng [et al.] // Phytochemis- try. - 2001. - Vol. 58. - № 8. - P. 1305-1309.
61. Identification and determination of ecdysones and flavonoids in *Serratula strangu- lata* by micellar electrokinetic capillary chromatography. / S. Wang [et al.] // PlantaMed. - 2002 - Vol. 68, N11. - P. 1029-1033.
62. Liquid chromatographic monitoring of phytoecdysteroid production of *Serratula wolffii*. // M. Bathori, A. Gergely, H. Kalasz // J. of Liquid Chromatography & Re-lated Technologies. - 2000 - Vol. 23, № 2. - P.281.
63. Insect hormones. The structure of ponasteron A, an insect-moulting hormone from the leaves of *Podocarpus nacaïi* Haj. / K. Nacanishi, M. Koreeda, S. Dasaki et al // J. Chem. Soc. Chem Commun. - 1966. - Vol. 24. - P. 915-917.
64. Galbraith, M.N. An insect-moulting hormone from a plant / M.N. Galbraith, D.H.S. Horn. / J. Chem. Soc. Chem. Commun. - 1966. - P.905-906
65. Яцюк Я.К. О выделении экдистерона / Я.К. Яцюк, Г.М. Сегаль // Химия природных соединений. -1970. -№2. -С. 281
66. В.П. Мишуков, В.Г. Зайнуллин, Г.А. Рубан, Н.С. Савиновская, В.В. Пунегов, Л.А. Башлыкова. – Сыктывкар, – (Коми научный центр УрО РАН). ИНТРОДУКЦИЯ *SERRATULA CORONATA* L. НА ЕВРОПЕЙСКОМ СЕВЕРО-ВОСТОКЕ. - 2008. – 192 с.
67. Абубакиров, Н.К. Гормоны линьки насекомых в растениях Средней Азии / Н.К. Абубакиров // Известия АН КазССР. Сер. хим. - 1984. - №4. - С.49- 53.
68. Зарембо, Е.В. Содержание 20-гидроэкдизона в видах родов *Rhaponticum* Ludw. и *Serratula coronata* L. флоры Дальнего Востока России / Е.В. Зарембо, Л.И. Соколова, П.Г. Горовой // Растительные ресурсы, - вып.3, - 2001,-С. 59-64.
69. Новосельская, И. Л. Фитоэктистероиды *Serratula coronata* L / И.Л. Новосельская, М.Б. Горовиц, Н. К. Абубакиров // Химия природных соединений. - 1981. - №5. - С.668-669.
70. Ревина, Г.А. Динамика содержания экдистерона в надземной части *Serratula coronata* L. и влияние на него света разного спектрального состава / Г.А. Ревина, Р.А. Карначук, Т.Я. Тайлашева // Растительные ресурсы. - вып.1,- 1986, - С. 70-72.
71. Galyautdinov, I.V. Phytoecdysteroids from *Serratula coronata* L. juice. / I.V. Galyautdinov, N.A. Veskina, D.V. Nedopekin. // International conference on natural products: chemistry, technology & madicinal perspectives. - Almaty, Kazakhstan. 2003. - P.138.

72. Gilgan, M.W. Separation of ecdysterone, inokosterone, makisterone A, aecdysone and ponasterone A by a combination of adsorbitive and reversedphase liquid chromatography. / M.W. Gilgan. // Journal of chromatography. 1976.-129.- P. 447-450.

73. Odinkov, V.N. Phytoecdysteroids from the juice of *Serratula coronata* L. (Asteraceae). / V.N. Odinkov, I.V. Galyautdinov, D.V. Nedopekin. // Insect biochemistry and molecular biology. - 2002. - Vol. 32. - Issue 2. - P. 161-165.

74. Велькина, Н.А. Новые экистероиды из *Serratula coronata* / Н.А. Велькина, И.В., Галютдинов, Л.М. Халилов и др. // Актуальные проблемы органической химии. Молодежная научная школа-конференция. - Новосибирск. -2003. - С.195.

75. Володин, В.В. Инокостерон и макистерон А из *Serratula coronata* L / В.В. Володин, В.Г. Лукша, Л. Дайнан и др. // Физиология растений. 1998.- Т.45. - №3. С. 378-382.

76. Пунегов, В.В. Метод внутреннего стандарта для определения экистероидов в растительном сырье и лекарственных формах с помощью ВЭЖХ / В.В. Пунегов, Н.С. Савиновская // Растительные ресурсы. - Выпуск 1. - Том 37. - 2001. - С. 97-102.

77. Gilgan, M.W. Separation of ecdysterone, inokosterone, makisterone A, aecdysone and ponasterone A by a combination of adsorbitive and reversedphase liquid chromatography. / M.W. Gilgan. // Journal of chromatography. 1976.-129.- P. 447-450.

78. New acetals of 20-hydroxyecdysone in the viticosterone E synthesis. / S.R. Nazmeeva, N.A. Veskina, D.V. Nedopekin et al. // International conference on natural products: chemistry, technology & madicinal perspectives. - Almaty, Kazakhstan, 2003. - P.139.

79. Odinkov, V.N. Isolation and identification of phytoecdysteroids from *Serratula coronata* L. juice and synthetic transformations of 20-hydroxyecdysone. / Odinkov V.N. // International conference on natural products: chemistry, technology & madicinal perspectives. Almaty, Kazakhstan, 2003. -P. 162.

80. Ревина, Г.А. Динамика содержания экистерона в надземной части *Serratula coronata* L. и влияние на него света разного спектрального состава / Г.А. Ревина, Р.А. Карначук, Т.Я. Тайлашева // Растительные ресурсы. - вып.1,- 1986, - С. 70-72.

81. Пчеленко, Л.Д. Адаптогенный эффект экистероидсодержащей фракции *Serratula coronata* L / Л.Д. Пчеленко, Г.И. Метелкина, СО. Володина // Химия растительного сырья, - 2002. - №1. - С. 69-80.

82. Алиева, М.И. Сравнительный аминокислотный состав растений - продуцентов экистероидов / М.И Алиева, О.А. Бездудная, СО. Володина и др. //Химия растительного сырья. -2001. -№1. - С.63-68.

83. Влияние флавоноидов растительного происхождения на перекисное окисление липидов / Е.Г. Доркина, Э.Т. Оганесян, М.Р. Хочава, Ю.А. Мальцев // Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения. Материалы III международного съезда. - Санкт-Петербург, 1999. - С.156-158.

84. Выделение, химический состав и гипополидемическая активность суммы флавоноидов из *Thermopsis altherniflora* / З.А. Хушбактова, С.Х. Файзиева, В.Н-Сыров//Химико-фармацевтический журнал. -2001. -№3. -С.35-38.
85. Гемореологические свойства экстрактов из некоторых растений, содержащих флавоноиды / М.Б. Плотников, А.А. Колтунов, О.И. Алиев и др. // Растительные ресурсы. - 1998.-№ 1.-С. 87-91.
86. Сейтеббетова, А.Ж. Природные фенольные соединения - перспективный источник антиоксидантов / А.Ж. Сейтеббетова, СМ. Адекенов, Алматы, 2001. - 165с.
87. Ratty, A.K. Interaction of flavonoids with 1,1-diphenil-2-picrylhydrazyl free radical, liposomal membranes and soybean lipoxygenase-1 // *Biochem. Pharmacol.* - 1988. - Vol.37. - №6. P.985-989.
88. Supression of photosensitized hemolysis by quercetin and promotion of supression by ascorbate / U. Takahama, Y. Sorata, C.-Y. Jan, M. Kimura // *Medical. Biochemical and Chemical Aspects of Free Radicals.* - Amsterdam. - 1989.-P.481-484.
89. Верещагин, В.И. Полезные растения Западной Сибири / В.И. Верещагин, К.А. Соболевская, А.И. Якубова. - М.: Наука, 1959. - 347с.
90. Крылов, Г.В. Растения здоровья / Г.В. Крылов, Н.Ф. Козаков, А.А. Лагерь. - Новосибирское книжное издательство, 1989. - 303 с.
91. Крылов, Г.В. Травы жизни и их искатели / Г.В. Крылов - Новосибирск, 1972. - 447 с.
92. Махлаюк, В.П. Лекарственные растения в народной медицине / В.П. Махлаюк. - Саратов, 1991. - 544 с.
93. Телятьев, В.В. Полезные растения Центральной Сибири / В.В. Телятьев. Иркутск, 1985. - 250 с.
94. Шретер А.И. Лекарственная флора советского Дальнего Востока / А.И. Шретер. - М.: Медицина, 1975. - 328 с.
95. Гаммерман, А.Ф. Словарь тибетско-латино-русских названий лекарственного растительного сырья, применяемого в тибетской медицине / А.Ф. Гаммерман, Б.В. Семочов.- Улан-Удэ. 1963.- 80с.
96. Махов, А.А. Зеленая аптека / А.А. Махов. - Красноярск, 1993. - 246 с.
97. Раны и их лечения в тибетской медицине. - Новосибирск: Наука, 1990. - 191с.
98. Дикорастущие полезные растения флоры Монгольской Народной Республики. - Л. 1985. - 235с.
99. Кормовые растения сенокосов и пастбищ СССР / И.В. Ларин, Ш.М. Агабабян, Т.А. Работнов и др. // М.: Л. - 1956. - Т.3. - 879 с.
100. Кухарева, А.В. Полезные травянистые растения природной флоры / А.В. Кухарева, Г.В. Пашина - Минск : Наука и техника, 1986. - 215 С.
101. Растительные ресурсы СССР. Цветковые растения, их химический состав, использование. Семейство Asteraceae (Compositae). - СПб.: Наука, 1993. - 352 с.

102. Влияние экдистерона на биосинтез белков и нуклеиновых кислот в органах мышц / И.Н. Тодоров, Ю.И. Митрохин, О.И. Ефремова // Химико-фармацевтический журнал. - Т. 34. - 2000. - №9 - С.3-5.
103. Зависимость структура - анаболическое действие фитоэкдистероидов, выделенных из растений центрально-азиатского региона / В.Н. Сыров, З. Саатов, Ш.Ш. Сагдуллаев, А.У. Маматханов // Химико-фармацевтический журнал. - Том35. -№12. - 2001. - С. 23-27.
104. Otaka, T. Stimulation of protein synthesis in mouse lever by ecdysterone / T. Otaka, S. Okui, M. Uchiyata // Chem. Pharm. Bull. - 1969. - VoU7. - P.75- 81.
105. Поиск новых противоязвенных средств из растений Сибири и Дальнего востока. / Е.Н. Амосова, Е.П. Зуева, Т.Г. Разина и др. // Экспериментальная и клиническая фармакология. -1998. - Том 61. - №6. - С.31 -35.
106. Гипогликемическая активность суммы фитоэкдистероидов из *Ajuga turkestanica* / Т.А. Кутепова, В.Н. Сыров, З.А. Хушбакова // Химикофармацевтический журнал. - Том 35. - №11. - 2001. - С.24-25.
107. Куркумов, А.Г. Противовоспалительные свойства экдистерона / А.Г.Куркумов, В.Н- Сыров // Медицинский журнал Узбекистана, - 1988. - X°10. - С. 68-70.
108. Гемореологические свойства экстрактов из некоторых растений, содержащих эдистероиды / М.Б. Плотников, А.А. Колтунов, О.И. Алиев и др. // Растительные ресурсы. - 1998. - № 1. - С. 91 -97.
109. Сыров, В.Н. Фитоэкдистероиды: биологические эффекты в организме высших животных и перспективы использования в медицине / В.Н. Сыров // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 1994. - Т. 57. - №5. - С. 61-66.
110. Антирадикальные и антиокислительные свойства экстрактов серпухи венценосной / М.Б. Плотников, А.С.Васильев, М.Ю.Маслов // Тезисы докладов научной конференции, посвященной 50-летию Алтайского государственного медицинского университета. - Барнаул, 2004. - С. 184- 187.
111. Dinan, L. Phytoecdysteroids: biological aspects. / Laurence Dinan // Phytochemistry. - 2000. - Vol. 57. - P. 325-339.
112. Гемореологическая активность экстрактов из содержащих эдистероиды растений при сахарном диабете у крыс / Васильев А.С., Плотников М.Б., Алиев О.И. и др. // Химия и технология растительных веществ. Тезисы докладов IV Всероссийской научной конференции. - Сыктывкар, 2006. - С.236.
113. Effect of vitamin D3, arginine, and a biologically active complex from *Serratula coronata* on free radical oxidation of lipids in vitamin D deficiency / A.Y. Kuz'menko, R.P. Morozova, Y.A. Nykolenko et al. // Ukr. Biokhim. Zh. - 1999. - №71(2). - P.69-74.
114. Identification of ligands and coligands for the ecdyson-regulated gene switch // E. Saez, M.C. Nelson, B. Eshelman et al. // Proc. Natr. Acad. Sci. USA. - 2000. - № 97. - P. 14512-14517

115. Molecular determinants of differential ligand sensitivities of insect ecdysteroid receptors / S.F. Wang, S. Ayer, W.A. Segraves et al. // *Mol. Cell. Biol.* - 2000. - №20. - P.3870-3879.
116. Ганиев, Ш.Г. Влияние экдизонсодержащих экстрактов из *Serratula sogdiana* Bunge и *Rhaponticum integrifolium* C. Winkl. на гусениц непарного шелкопряда / Ш.Г. Ганиев // *Растительные ресурсы*, - вып.4,- 1987.- С. 634-636.
117. Гормональное, токсическое и адаптогенное влияние экдистероидов *Serratula coronata* L. на личинок *Ephestia Kuhniella* Zell / К.Г. Уфимцев, Т.И. Ширшова, А.П. Якимчук, В.В. Володин // *Растительные ресурсы*. - вып.2, - том 38. - 2002.
118. Дайнан, Л. Стратегия оценки роли фитоэкдистероидов как детеррентов по отношению к беспозвоночным - фитофагам / Л. Дайнан // *Физиология растений*. - 1998. - Т. 45, № 3. - С. 347-359.
119. Slama, K. Insect hormones - ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates / K. Slama, R. Lafont. // *Europ. J. Entomol.* - 1995. - Vol. 92. - P. 355- 377.
120. Влияние экдистена на показатели половой функции в эксперименте и клинических условиях / Ю.Р. Мирзаев, В.Н. Сыров, С.А. Хрушев, С.Д. Искандерова // *Экспериментальная и клиническая фармакология*, - 2000. - №4. - с. 35-37.
121. Лафон, Р. Фитоэкдистероиды и мировая флора: разнообразие, распределение и эволюция / Р. Лафон // *Физиология растений*. - 1998. - Т.45. - №3. - С. 326-346.
122. Химическая модификация 20-гидроэкдизона и исследование мембранотропных свойств его производных / Н.К. Политова, Л.А. Ковлер, В.В. Володин и др. // *Химия растительного сырья*. - 2001. - №2. - С .69-81.
123. Meybeck, A. Past, present and future of liposome cosmetics / A. Meybeck, O. Braun-Falco, H.C.Korting, H.I.Maibach. // *Liposome dermatics*. - Berlin Heidelberg: Springer-Verlag- 1996.-P.341-345.
124. Володин, В.В. Биологическая активность 20- гидроксидизона и его ацетатов / В.В. Володин, Т.И. Ширшова, С.А. Бурцева, М.В. Мельник // *Растительные ресурсы*. - М., 1999. - вып.2. - С.76-81
125. Володина, С.О. Технология получения субстанции 20-гидроэкдизона из надземной части *Serratula coronata* L. / С.О. Володина, В.В. Володин // *Поиск, разработка и внедрение новых лекарственных средств и организационных форм фармацевтической деятельности*. - матер, международной научной конф. Томск, 2000. - С213.
126. Koolman, J. Review metabolism of ecdysone / J. Koolman // *Insect Biochem.* - 1982. - Vol. 12, № 3. - P.225-250.
127. Screening plants of European North-East Russia for ecdysteroids / V.Volodin, I.P.Chadin, L.Dinan // *Biochem. Ecol.* - 2002. - Vol. 30. - P.525-578.

128. Амосова, Е. Н. Фармакологическая активность экстракта из *Serratula coronata* L / Е.Н. Амосова, Т.Г. Харина. // Растительные ресурсы. - М. - 1989. - вып.2. - С.258-262.
129. Амосова, Е.Н. Влияние препарата серпухи венценосной на развитие реакции острого стресса у мышей / Е.Н. Амосова, Т.Г. Харина, К.В. Яременко // Вторая республиканская конференция по медицинской ботанике. Тез. докл. - Киев. - 1988. - С.185.
130. Ахрем, А.А. Экдистероиды: химия и биологическая активность / А.А. Ахрем, Н.В. Ковганко. - Минск : Наука и техника, 1989. - 327 с.
131. Биологическая эффективность двух кормовых добавок, содержащих экдистероиды *Serratula coronata* L / В.Г. Зайнулин, В.П. Мишуров, В.В. Пунегов и др. // Растительные ресурсы. - Вып.2. - 2003. - с. 95-103.
132. Ресурсосберегающая кормовая добавка для цыплят-бройлеров с фитоэкдистероидами растения *Serratula coronata* L / В.В. Пунегов, Н.С. Савиновская, В.П. Мишуров и др. II Материалы научн.-практ. конф. «Внедрение ресурсосберегающих технологий в сельскохозяйственном производстве». - г. Новокузнецк, 2001. - С. 29-30.
133. Амосова, Е.Н. Кормовая добавка для сельскохозяйственных животных из серпухи венценосной / Е.Н. Амосова, Т.Г. Харина, А.М. Дыгай // Труды первой всероссийской конференции по ботаническому ресурсоведению. - 1996.-С. 225-226.
134. Василенко, Т.А. Использование муки из *Serratula coronata* L. для стимуляции воспроизводительной способности коров / Т.А. Василенко, Л.Ю. Рубцова, В.В. Пунегов и др. // Эколого-популяционный анализ кормовых растений естественной флоры, интродукция и использование: Матер. IX междунар. симпоз. по новым кормовым растениям, г. Сыктывкар. - 1999.- С.33.
135. Insect hormones in vertebrates: anabolic effects of 20-hydroxyecdysone in Japanese quail / K. Slama, K. Koudela, J. Tenora, A. Mathova. // Experimentia. -1996 - Vol.52. - №7. - P. 702-706.
136. Промышленная технология лекарств: учебник в 2-х т. Том 2 / В.И. Чуешов, М.Ю. Чернов, Л.М. Хохлова и др.; под ред. проф. В.И. Чуешова. - Харьков, 2002. - 716 с.
137. Новосельская, И.Л. Фитоэкдизоны *Serratula* / И.Л. Новосельская, М.Б. Горовиц, Н.К. Абубакиров // Химия природных соединений, - 1975. - №3. - С.429-430.
138. Зацны, И.А. Фитоэкдизоны *Serratula*. Витикостерон E из *Serratula sogdiana* и его частичный синтез / И.А. Зацны, М.Б. Горовиц, Н.К. Абубакиров // Химия природных соединений. - 1973. - №2. - С. 175-178.
139. Яцюк Я.К. О выделении экдистерона / Я.К. Яцюк, Г.М. Сегаль // Химия природных соединений. -1970. -№2. -С. 281
140. В.П. Мишуров, В.Г. Зайнуллин, Г.А. Рубан, Н.С. Савиновская, В.В. Пунегов, Л.А. Башлыкова. – Сыктывкар, – (Коми научный центр УрО РАН).

ИНТРОДУКЦИЯ SERRATULA CORONATA L. НА ЕВРОПЕЙСКОМ СЕВЕРО-ВОСТОКЕ. - 2008. – 192 с.

141. Гауптман З. Органическая химия: пер. с нем. П.Б. Терентьева, С.С. Чуранова / З. Гауптман, Ю. Грефе, Х. Ремане; под ред. В.М. Потапова. – М.: Химия, 1979. – 831 с.

142. Неницеску К.Д. Органическая химия: пер. с румын. Л. Бырлэдяну В 2-х т. Т 2 / К.Д. Неницеску; под ред. М.И. Кабачника. – М.: ИЛ, 1963. – 1048 с.

143. Химический анализ лекарственных растений: учебное пособие для фармацевтических вузов / Е.А. Ладыгина, Л.Н. Сафронич, В.Э. Отряшенкова [и др.]; под ред. Н.И. Гринкевич, Л.Н. Сафронич. – М.: Высш. школа, 1983. – 176 с.