

На правах рукописи

ИМАЧУЕВА ДЖАВГАРАТ РУСЛАНОВНА

**СРАВНИТЕЛЬНОЕ ФАРМАКОГНОСТИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ
НЕКОТОРЫХ ВИДОВ РОДА КОПЕЕЧНИК (*HEDYSARUM* L.),
ПРОИЗРАСТАЮЩИХ НА ТЕРРИТОРИИ СЕВЕРНОГО КАВКАЗА**

14.04.02 – Фармацевтическая химия, фармакогнозия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата фармацевтических наук

Самара 2021

Диссертационная работа выполнена в Пятигорском медико- фармацевтическом институте – филиале федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

кандидат фармацевтических наук, доцент **Серебряная Фатима Казбековна**

Официальные оппоненты:

Писарев Дмитрий Иванович, доктор фармацевтических наук, доцент, Аграрно-технологический институт федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов», агробиотехнологический департамент, профессор департамента.

Шмыгарева Анна Анатольевна, доктор фармацевтических наук, доцент, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Оренбургский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра управления и экономики фармации, фармацевтической технологии и фармакогнозии, профессор кафедры.

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Уфа.

Защита диссертации состоится «__» _____ 202_ г. в 1_00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.085.06 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (443079, г. Самара, пр. К. Маркса, 165 Б).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке (443001, г. Самара, ул. Арцыбушевская, 171) и на сайте (<http://www.samsmu.ru/scientists/science/referats/>) федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан «__» _____ 202_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат фармацевтических наук, доцент

Жданова Алина Валитовна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Для дальнейшего развития современной отечественной фармации значительный интерес представляет изучение сырьевых источников растительного происхождения для получения биологически активных веществ, обладающих выраженной фармакологической активностью. В настоящее время особенно остро стоит проблема получения противовирусных и антибактериальных средств растительного происхождения (Кудаев В.Б. и др., 1972; Федорова Ю.С. и др., 2018). На данный момент проблема хронических рецидивирующих вирусных заболеваний очень актуальна. Согласно данным ВОЗ около 67% населения Земли страдают от заболеваний различных органов и систем, вызванных вирусом простого герпеса.

Мангиферин (2-С-β-D-глюкопиранозил-1,3,6,7-тетрагидроксиксантон) относится к группе собственно ксантонов, является наиболее широко распространенным представителем С-гликозидов и обладает противовирусными и противобактериальными свойствами (Глызин В.Н. и др. 1986). В РФ источниками мангиферина являются виды растений рода *Hedysarum* L., сем. *Fabaceae* (Высочина Г.И. и др. 2011; Кукушкина и др. 2011). Так на основе сырья *Hedysarum alpinum* L. и *Hedysarum flavescens* Rgl. et Sohmalh. отечественными учеными разработан противовирусный препарат «Алпизарин», который обладает активностью в отношении ДНК-содержащих вирусов (*Herpes simplex*, *Varicella zoster*, *Cytomegalovirus*), иммуностимулирующими свойствами, оказывает бактериостатическое действие в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. ЗАО «Фармцентр ВИЛАР» (Россия) выпускает данный в двух формах выпуска «Алпизарин мазь» и «Алпизарин таблетки» (Федорова Ю.С. и др., 2011).

Совершенно очевидной является необходимость расширения сырьевой базы для производства противовирусных препаратов широкого спектра действия за счет исследования новых представителей рода *Hedysarum* L., произрастающих на территории Северного Кавказа. В этой связи комплексный фитохимический и ботанико-фармакогностический анализ *Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum grandiflorum* Pall., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss., как перспективных отечественных сырьевых источников мангиферина представляется актуальной задачей.

Степень разработанности темы исследования. Среди источников отечественной литературы нами обнаружены данные о биологических особенностях развития видов рода *Hedysarum* L. (Русакова С.В. и др., 1977; Зубаирова Ш.М., 2013; Мулдашев А.А. и др., 2014). Изучены морфолого-анатомические диагностические признаки *Hedysarum fruticosum* Pall., *Hedysarum alpinum* L., *Hedysarum austrosibiricum* В. Fedtsch., *Hedysarum consanguineum* DC., *Hedysarum neglectum* Ledeb., *Hedysarum theinum* Krasnob (Попова И.А., 2014; Коган Е.Г. и др., 2016).

Анализ состава суммы ксантонов в пересчете на мангиферин, а также динамика их накопления в различных органах некоторых видов рода *Hedysarum* L., в том числе *Hedysarum austrosibiricum* В. Fedtsch., *Hedysarum neglectum* Ledeb., *Hedysarum theinum* Krasnob., *Hedysarum gmelinii* Ledeb. и *Hedysarum tschuense* А. I. Pjaket А. L. Ebel. и 4 вида, которые произрастали на территории Центрального сибирского ботанического сада: *Hedysarum alpinum*, *Hedysarum flavescens*, *Hedysarum neglectum* и *Hedysarum theinum* (Комиссаренко А.Н. и др., 1994; Неретина О.В. и др., 2002; Кукушкина Т.А. и др., 2011; Высочина Г.И. и др., 2011). В результате исследований зарубежными и отечественными учеными в различных видах рода *Hedysarum* L. были выделены: аминокислоты, углеводы, липиды, жирные кислоты; а среди

вторичных метаболитов определены: терпены, флавоноиды, изофлавоноиды, ксантоны и их аналоги, дубильные вещества, фитостероиды, серо- и азотсодержащие органические вещества (Федорова Ю.С. и др., 2018; Dong Y. И др., 2013).

Фармакологическая активность экстракта копеечника изучалась во Всероссийском институте лекарственных и ароматических растений (ВИЛАР), связанная с изучением свойств алпизарина. Были проведены клинические исследования, благодаря которым было установлено, что «Алпизарин» оказывает противовирусное действие на вирусы *Herpes simplex*, *Cytomegalovirus*, *Varicella zoster*. Препарат обладает иммуномодулирующими свойствами, действуя на клеточное и гуморальное звенья иммунитета, повышает выработку гамма интерферона. Антимикробные свойства алпизарина изучали в экспериментах *in vitro* в стандартных условиях принятых для скрининга антимикробных средств. Установлено ингибирующее действие алпизарина в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий, туберкулезных микобактерий.

В 2011 году были проведены комплексные исследования некоторых видов рода *Hedysarum* L., а именно *H. theinum*, *H. neglectum* и *H. alpinum*. Был изучен фитохимический состав и исследована фармакологическая активность данных видов рода *Hedysarum* L. (Федорова Ю.С. и др., 2018).

Целью работы и основные задачи исследования

Целью диссертационного исследования является сравнительное изучение растений видов рода *Hedysarum* L., в том числе *Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss., *Hedysarum grandiflorum* Pall., как дополнительных сырьевых источников мангиферина.

Для реализации поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. провести сравнительное морфолого-анатомическое исследование указанных видов рода *Hedysarum* L. (*Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss., *Hedysarum grandiflorum* Pall.) и выявить основные морфолого-анатомические диагностические признаки;
2. исследовать возможность использования молекулярно-генетического метода для определения подлинности лекарственного растительного сырья (ЛРС) на примере видов рода *Hedysarum* L., изучить филогенетические связи и выделить наиболее перспективные с фармакогностической точки зрения виды;
3. разработать эффективную методику количественного определения суммы ксантонов в пересчете на мангиферин методом УФ-спектрофотометрии и мангиферина методами капиллярного электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии из указанных видов рода *Hedysarum* L.;
4. изучить фитохимический состав перечисленных видов рода *Hedysarum* L. (*Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss., *Hedysarum grandiflorum* Pall.);
5. разработать проекты нормативной документации, а также методики стандартизации травы исследуемых видов рода *Hedysarum* L., включая определение показателей его качества (проект ФС, инструкция по сбору и сушке растительного сырья);
6. разработать и внедрить основные методики интродукции исследуемых видов на территории Горного ботанического сада Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Дагестанский федеральный исследовательский центр» Российской Академии Наук (ФГБУН ДФИЦ РАН). Изучить биологические особенности видов рода *Hedysarum* L. (*Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss.,

Hedysarum grandiflorum Pall.) в ареале естественного произрастания и в условиях интродукции на территории Горного ботанического сада ФГБУН ДФИЦ РАН.

Научная новизна. Впервые определены морфолого-анатомические диагностические признаки исследуемых видов рода *Hedysarum* L. (*Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss., *Hedysarum grandiflorum* Pall.), необходимые для стандартизации ЛРС. Внедрены показатели каулифолиарной микроморфологии для проведения диагностики растительных объектов на примере рода *Hedysarum* L.

Впервые проведены молекулярно-генетические исследования и определены морфометрические показатели, позволяющие устанавливать корреляции между морфологическими, молекулярно-генетическими и фитохимическими показателями видов, отнесенных к определенным секциям рода, а также осуществить прогноз накопления ксантонов в ранее не исследуемых видах.

Проведены интродукционные исследования *Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss., *Hedysarum grandiflorum* Pall. на территории Горного ботанического сада ФГБУН ДФИЦ РАН (станция Цудахар), в том числе определены основные фазы развития, составлены фенологические спектры.

В рамках фитохимического скрининга в исследуемых нами объектах обнаружены такие биологически активные вещества (БАВ), как флавоноиды, лейкоантоцианы, дубильные вещества, полисахариды, сапонины (тритерпеновые соединения). Впервые в траве трех видов рода *Hedysarum* L. обнаружено присутствие аминокислот, основная часть которых относится к группе незаменимых аминокислот, наличие пролина и фенилаланина доказывает присутствие ксантонов. Полученные результаты исследования необходимы при составлении комплексной метаболомной оценки ЛРС видов рода *Hedysarum* L.

Проведено комплексное изучение качественного анализа и количественного содержания суммы ксантонов и, собственно, мангиферина методами тонкослойной и бумажной хроматографии, УФ-спектрофотометрии, капиллярного зонного электрофореза, а также высокоэффективной жидкостной хроматографии.

В рамках комплексных фармакогностических исследований трех видов *Hedysarum* L. нами разработана методика определения количественного содержания суммы ксантонов в пересчете на мангиферин методом УФ-спектрофотометрии. Методика учитывает основные физико-химические свойства ксантонов, характеризуются воспроизводимостью, высокой точностью, простотой исполнения, позволяют проводить как скрининговую оценку различных сырьевых объектов, содержащих производные мангиферина, так и стандартизацию заготовленного ЛРС копеечника.

Разработанные методики апробированы на траве видов рода *Hedysarum* L., собранных и высушенных с учетом, правил и требований заготовки ЛРС. В результате установлено, что наибольшим количественным содержанием суммы ксантонов в пересчете на мангиферин отличается трава *Hedysarum caucasicum* M.Bieb. ($0,62 \pm 0,021\%$). Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего исследования травы *Hedysarum caucasicum* M.Bieb. как дополнительного сырьевого источника мангиферина. Проведена валидация методики количественного определения суммы ксантонов в пересчете на мангиферин в траве *Hedysarum caucasicum* M.Bieb.; на основании полученных данных установлено, что предложенная методика является высокочувствительной, воспроизводимой и пригодной для использования.

Разработаны основные критерии идентификации и оценки качества изучаемого сырья.

На основе проведенных исследований разработана методика определения количественного содержания суммы ксантонов в пересчете на мангиферин в условиях производства, а также методика стандартизации, ставшая основанием для разработки проекта ФС «Копеечника кавказского трава».

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость исследования заключается в накоплении объема знаний в области корреляции между морфологическими, молекулярно-генетическими и фитохимическими показателями видов, выявленными диагностическими морфолого-анатомическими признаками, в том числе и каулифолиарной зоны, об условиях интродукции и фенологических наблюдениях за указанными видами рода *Hedysarum* L.

Практическая значимость заключается в обосновании возможности интродукции видов рода *Hedysarum* L., а именно *Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss., *Hedysarum grandiflorum* Pall. в условиях ботанических садов для обеспечения сырьевой базой для производственных целей получения мангиферина. Благодаря комплексному изучению морфометрических, эколого-ценотических показателей *Hedysarum caucasicum* M.Bieb., а также проведенным интродукционным исследованиям и фенологическим наблюдениям, включенным в проект «Инструкции по сбору и сушке копеечника кавказского травы», разработан проект ФС «Копеечника кавказского трава». Методики идентификации и количественного определения суммы ксантонов в пересчете на мангиферин внедрены в учебный процесс аспирантов кафедры фармакогнозии, ботаники и технологии фитопрепаратов Пятигорского медико-фармацевтического института (ПМФИ) – филиала ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России, а также студентов, обучающихся на кафедре фармации ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет».

Методология и методы исследования. Исследование проводилось в период с 2016 по 2020 гг. при использовании фармакогностических методов (морфолого-анатомические, статистические методы исследований, фармакопейные методики Государственной фармакопеи Российской Федерации (ГФ РФ)), химических и физико-химических методов анализа (спектрофотометрия, тонкослойная хроматография, высокоэффективная жидкостная хроматография, капиллярный электрофорез). Полученные данные подвергались статистической обработке результатов.

Результаты фитохимического анализа, а также биологические особенности развития видов рода *Hedysarum* L. составили теоретическую основу исследования. Объектами исследования послужили три вида рода *Hedysarum* L., произрастающие на территории Северного Кавказа. Заготавливали сырье в фазы цветения и плодоношения с 2016 по 2019 гг. в различных районах по природным условиям произрастания.

Основные положения, выносимые на защиту:

- Основные диагностические признаки, выявленные в результате сравнительного морфолого-анатомического исследования видов рода *Hedysarum* L. (*Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss., *Hedysarum grandiflorum* Pall.).
- Филогенетические связи в пределах рода *Hedysarum* L. на примере северокавказских видов рода *Hedysarum* L., обнаруженные с использованием молекулярно-генетических методов.
- Результаты фитохимического анализа травы, заготовленной от *Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss., *Hedysarum grandiflorum* Pall.

- Методики качественного анализа и количественного определения суммы ксантонов в пересчете на мангиферин методом УФ-спектрофотометрии и мангиферина методом капиллярного электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии травы исследуемых видов.

- Биологические особенности видов рода *Hedysarum* L. (*Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss., *Hedysarum grandiflorum* Pall.) в условиях естественного произрастания и в условиях интродукции на территории Горного ботанического сада ФГБУН ДФИЦ РАН.

- Результаты разработки показателей подлинности и качества травы *Hedysarum caucasicum* M.Bieb.

Степень достоверности. Полученные результаты достоверны, благодаря использованию современного сертифицированного и поверенного оборудования, множественной повторности, статистической обработке и валидационной оценке.

Апробация работы. Фрагменты диссертационной работы были доложены на научно-практических конференциях: IV Международная научно-практическая конференция «Молодые ученые и фармация XXI века» ФГБНУ ВИЛАР (г. Москва, 2016 г.); XXIV Российском национальном конгрессе «Человек и лекарство» (г. Москва, 2017 г.); Всероссийской научно-практической конференции с международным участием посвященная 95-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РФ, д.фарм.н., профессора Д.А. Муравьевой. (г. Пятигорск, 2017 г.); IV Всероссийской научно-практической конференции «Беликовские чтения» (г. Пятигорск, 2017 г.); V научно-практической конференции с международным участием «Молодые ученые и фармация XXI века» ФГБНУ ВИЛАР (г. Москва, 2017 г.); Международная научно-практическая конференция, посвященная 95-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РФ, д.фарм.н., профессора Д. А. Муравьевой «Актуальные вопросы современной фармакогнозии» (г. Пятигорск, 2018 г.); IV Всероссийской научно-практической конференции «Беликовские чтения» (г. Пятигорск, 2018 г.); Научно-методическая конференция «IV Гаммермановские чтения» (г. Санкт-Петербург, 2019 г.); Международная научно-практическая конференция, посвященная 95-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РФ, д.фарм.н., профессора Д.А. Муравьевой «Актуальные вопросы современной фармакогнозии» (г. Пятигорск, 2019 г.); Международный молодежный форум «Неделя науки 2019» (г. Ставрополь, 2019 г.); IX Международная научно-практическая конференция «Молодые ученые в решении актуальных проблем науки» (г. Владикавказ, 2019 г.); I Всероссийская научно-практическая конференция, посвященная 20-летию фармацевтического факультета «Актуальные вопросы фармации, фармакологии и клинической фармакологии» (г. Махачкала, 2019 г.); PSE E-CONGRESS. Plant Derived Natural Products as Pharmacological and Nutraceutical Tools (2020).

Публикации. Основные результаты диссертационного исследования отражены в 15 научных публикациях, из них 3 статьи в журналах, рекомендованных ВАК Министерства науки и высшего образования РФ и 3 статьи в журналах, входящие в международную базу данных Scopus и 1 научная монография.

Внедрение результатов исследования. Разработаны: проект ФС «Копеечника кавказского трава» как дополнительного сырьевого источника мангиферина, апробированный на базе ЗАО «ВИФИТЕХ» (Московская область), проект «Инструкции по сбору и сушке

копеечника кавказского травы» апробирован в Горном ботаническом саду ФГБУН ДФИЦ РАН (г. Махачкала) и ООО «Витаукт-Пром» (г. Майкоп).

Методики количественного определения суммы ксантонов в пересчете на мангиферин методом УФ-спектрофотометрии и количественного определения мангиферина методами капиллярного электрофореза и ВЭЖХ используются в работе ООО «Витаукт-Пром», ЗАО «ВИФИТЕХ».

Методики идентификации суммы ксантонов в пересчете на мангиферин внедрены в учебный процесс для аспирантов на кафедре фармакогнозии, ботаники и производства фитопрепаратов ПМФИ – филиала ФГБОУ ВО «ВолгГМУ» Минздрава России и студентов 3 и 4 курса фармацевтического факультета на кафедре фармации ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет».

Личный вклад автора. Автор диссертационной работы принимал личное участие в выборе темы научной работы, постановке цели и задач исследования, в выполнении экспериментальных исследований, анализе и обобщении полученных результатов и их статистической обработке, в написании глав диссертационной работы, а также в подготовке публикаций по теме диссертации.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности. Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 14.04.02 – фармацевтическая химия, фармакогнозия, а именно: пункту 5 – изучение вопросов рационального использования ресурсов лекарственного растительного сырья с учетом влияния различных факторов на накопление биологически активных веществ в сырье и пункту 6 – изучение химического состава лекарственного растительного сырья, установление строения, идентификация природных соединений, разработка методов выделения, стандартизации и контроля качества лекарственного растительного сырья и лекарственных форм на его основе.

Объём и структура диссертации. Содержание работы представлена на 203 страницах машинописного текста и состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, списка сокращений, списка литературы, который включает 218 работ, из которых 83 – на иностранных языках, и приложений. Диссертация содержит 31 таблицу и 45 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Объекты и методы исследования

Объектами исследования данной диссертационной работы явились образцы сырья видов рода *Hedysarum* L., а именно *Hedysarum caucasicum* M.Bieb., *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss., *Hedysarum grandiflorum* Pall., заготовленные в период с 2016 по 2019 гг.

Морфолого-анатомическое исследование осуществляли с использованием микроскопа «Биомед 6», увеличение 640х, 160х. Микрофотографии выполняли цифровой камерой «DCM 510» в программе Score. Последовательность ITS1-5.8S-ITS2 рДНК проводили по методу Сэнгера (СТАВ). Для амплификации использовали реактивы Dream Taq PCR Master Mix (Thermo Scientific). Полимеразная цепная реакция была проведена на амплификаторе C1000 Thermal Cycler (Bio-Rad, USA). Для секвенирования использовался Big Dye Terminator Kit v.2.0 (Perkin Elmer Life Sciences, Inc., USA) и секвенатор ABI Prizm 3130 (Applied Biosystems, UK). Интродукционные исследования проводили методами: полевой описательный метод, эколого-географический метод, сравнительно эколого-морфологические стационарные методы. Для определения урожайности сырья в условиях интродукции использовали метод расчета урожайности при использовании метода учетных площадок.

Идентификацию мангиферина проводили методом тонкослойной хроматографии использовали пластинки «Sorbfil ПТСХ-АФ-А». Стандартным образцом для качественного и количественного определения являлся мангиферин (Sigma-Aldrich, $\geq 99\%$). Спектрофотометрическое изучение количественного определения суммы ксантонов в пересчете на мангиферин проводили на спектрофотометре СФ-2000, ЗАО «ОКБ СПЕКТР», Санкт-Петербург, Россия. Количественное определение мангиферина проводили на системе капиллярного электрофореза «Капель-105м» (ОАО «Люмэкс-маркетинг», Россия) с кварцевым капилляром Lэфф/Lобщ=50/60 см, ID=75 мкм и жидкостном хроматографе Shimadzu Prominence LC-20AD, с дегазатором DGU-20A3R; колонка 250 × 4,6 мм, C18 (размер частиц сорбента 5 мкм) категория L1 по USP. Качественный и количественный анализ аминокислот проводили на аминокислотном анализаторе AminoAcidAnalyzer AAA 339 M (Mikrotechna) по методике указанной в ГОСТ 32195-2013.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Сравнительное морфолого-анатомическое исследование видов рода *Hedysarum* L.

Проведено сравнительное морфолого-анатомическое исследование трех видов рода *Hedysarum* L., произрастающих на Северном Кавказе. Установлены наиболее значимые диагностические морфологические признаки, предоставляющие установить видовую принадлежность ЛРС, указанные в таблице 1.

Таблица 1 - Сравнительная морфологическая характеристика видов рода *Hedysarum* L., произрастающих на территории Северного Кавказа

Вид	<i>Hedysarum caucasicum</i> M. Bieb.	<i>Hedysarum grandiflorum</i> Pall.	<i>Hedysarum daghestanicum</i> Rupr. ex Boiss.
Жизненная форма, побеги	Растение высокое, 30-50 см высотой. Нижние междоузлия не укороченные.	Многолетник 20-40 см высотой. Бесстебельное или почти бесстебельное. Прилистники крупные, перепончатые, сросшиеся, бурые, рассеянно-волосистые.	Бесстебельный стержнекорневой многолетник. Цветоносы с кистями длиной 10-25 см. Все части растения имеют сероватый налет
Строение листьев	Листья состоят из 7-12 пар эллиптических или яйцевидно-продолговатых листочков с остроконечием на верхушке. Опушение не развито.	Листья черешковые, коротко прижато-волосистые опушенные. Листочки 1-4-парные, яйцевидные или широко-эллиптические, крупные, сверху слабо волосистые, снизу густо серебристо-шелковистые.	Листья непарно-перистосложные, с 3-4-парами листочков, листочки продолговатые, длиной до 18 мм и шириной до 8 мм. Верхушечный листочек более крупный. Прилистники сросшиеся.
Строение соцветий и	Кисти на длинных ножках, в 1 ¹ / ₂ -2 раза длиннее листьев, не очень густые. Нижний зубец чашечки равен трубочке. Венчик темно-пурпуровый	Кисти многоцветковые, с отклоненными цветками. Прицветники ланцетные, светло-бурые, волосистые, чашечка колокольчатая, зубцы ее линейно-шиловидные, волосистые, Венчик желтый.	Кисти немногочетковые, густые. Чашечка в 4 раза короче венчика. Лодочка короче флага и в 2 раза длиннее крыльев. Цветки крупные, кремово-белые или фиолетовые.

Строение плодов	Членики боба не крупные, гладкие или слегка зубчатые.	Бобы 2—5-членистые, членики округлые, густо беловолосистые, сетчато-ребристые, по краям с шипиками, загнутыми внутрь	Бобы из 2–4 члеников. Членики чечевицеобразные, бородавчатые
------------------------	-------------------------------------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------

При сравнительном анализе анатомического строения стебля выявлены общие черты, к которым относятся многогранная форма стебля на поперечном сечении, опушение представлено простыми двуклеточными волосками, которые имеют зауженное основание и расширенную структуру, характерной особенностью волосков является бородавчатость кутикулы.

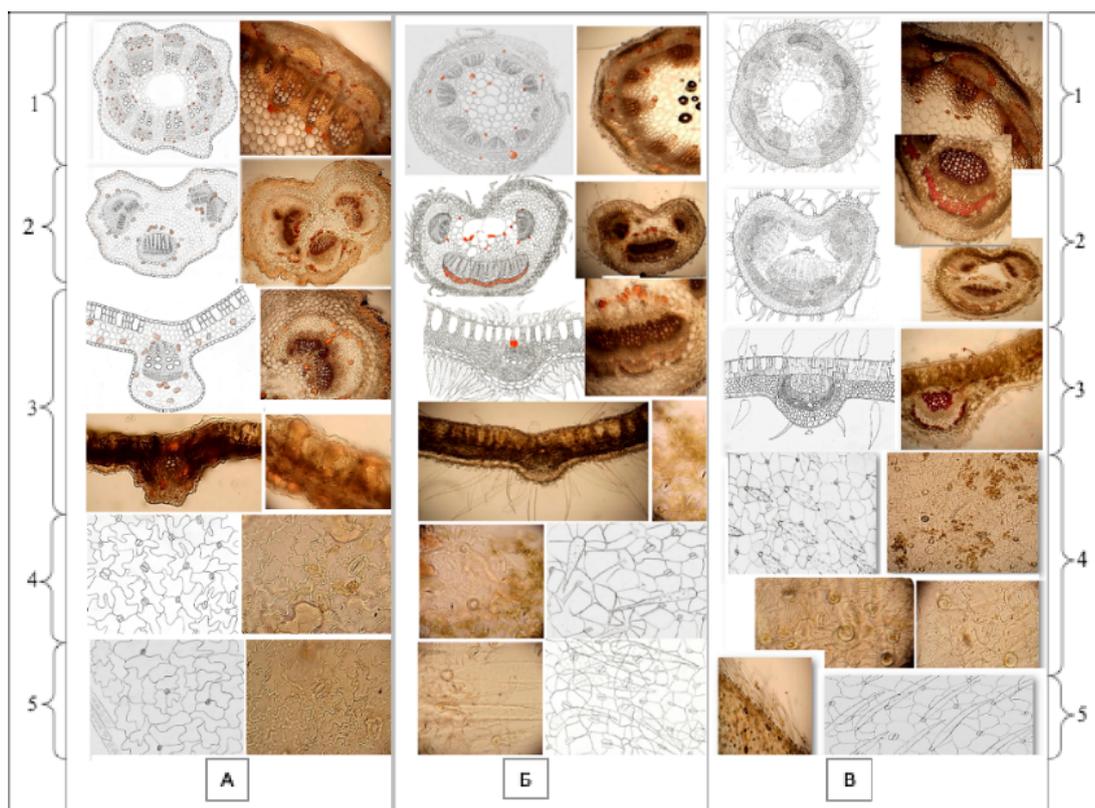


Рисунок 1 - Микроскопические признаки надземных органов *H. caucasicum* M.Bieb. (А), *H. daghestanicum* Rupr. ex Boiss. (Б), *H. grandiflorum* Pall. (В):

1. Поперечный срез стебля в нижней части; 2. Поперечный срез черешка листа в нижней части; 3. Поперечный срез листовой пластинки; 4. верхняя эпидерма листовой пластинки; 5. нижняя эпидерма листовой пластинки.

При сравнительном изучении анатомического строения каулифолиарной системы основное внимание было привлечено к анатомическому строению черешка и рахиса сложного листа. Выявлены следующие различия – изменяется форма на поперечном сечении черешка сложного листа от явно седловидной до округло-треугольной формы, меняется количество ребер на абаксиальной стороне. Выявлены различия, касающиеся строения и расположения колленхимы, склеренхимы и проводящей системы. Проводящая система черешка и рахиса сложного листа представлена тремя крупными и 2-7 мелкими проводящими пучками.

Все проводящие пучки имеют выраженное коллатеральное строение, при этом один крупный, дорзальный проводящий пучок, расположен на адаксиальной стороне, он имеет характерную округлую или полулунную форму и армирован склеренхимными волокнами со стороны флоэмы. Два вентральных проводящих пучка более мелкие и располагаются обычно в зоне ребер, также армированы склеренхимой со стороны флоэмы. Количество и расположение дополнительных мелких проводящих пучков в зависимости от той зоны черешка или рахиса, в которой выполнен срез может изменяться. Так, для зоны рахиса характерно обычно 2-4 дополнительных проводящих пучка, либо они полностью отсутствуют. Количество и расположение проводящих пучков нам представляется наиболее интересным и более информативным с точки зрения диагностики данного вида, произрастающих в различных экологических условиях (рис. 1). При проведении комплексного морфолого-анатомического исследования трех видов рода *Hedysarum* L., выявлены диагностические признаки, которые представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Сравнительные анатомические диагностические признаки видов рода *Hedysarum* L., произрастающих на Северном Кавказе

Наименование вида	<i>H. caucasicum</i> M. Bieb.	<i>H. grandiflorum</i> Pall.	<i>H. daghestanicum</i> Rupr. ex Boiss.
Тип строения листа	дорзовентральный	дорзовентральный	дорзовентральный
Структура палисадного мезофилла	Палисадный мезофилл под верхней эпидермой в 2 слоя	Палисадный мезофилл в 1, 2 или 3 слоя, в области главной жилки слой мезофилла не разрывается.	Палисадный мезофилл под верхней эпидермой в 3-4 слоя, не прерывается в зоне центральной жилки.
Наличие вместилищ	отдельные вместилища с содержимым оранжевого цвета.	Между клетками палисадного мезофилла обнаружены крупные вместилища овальной формы, заполненные содержимым оранжевого цвета	Между клетками палисадного мезофилла расположены крупные вместилища вытянутой прямоугольной формы в 1 слой.
Тип листа	амфистоматический	амфистоматический	амфистоматический
Типы устьичных аппаратов	анизоцитный и аномоцитный	анизоцитный	анизоцитный.
Трихомы, наличие и особенности строения	Трихомы отсутствуют	Простые волоски с характерным расширением в основаниях	Простые одноклеточные волоски с характерной структурой кутикулы
Форма черешка листа на поперечном сечении	V-образная или округло-треугольная	V-образная	Седловидная

Тип проводящей системы черешка, количество и расположение проводящих пучков	пучкового типа, 6 проводящих пучков, 1 расположен на дорзальной стороне, а 5 - на вентральной.	пучкового типа, 3 коллатеральными пучками, 1 расположен на дорзальной стороне, а 2 на вентральной.	пучкового типа, 5 коллатеральных пучков, 3 соединены между собой и расположены в дорзальной части, 2 мелких расположены в вентральной.
Форма стебля на поперечном сечении	многогранная или ребристая	ребристая	многогранная
Структура проводящей системы	проводящие пучки открытые коллатеральные, в количестве 13-15	проводящие пучки коллатеральные, в количестве 7-12	проводящие пучки открытые, коллатеральные, в количестве 10
расположение идиобластов	клетки межпучковой паренхимы, обкладочные клетки вокруг проводящих пучков	клетки паренхимы сердцевины	клетки паренхимы сердцевины
Колленхима, количество слоев и структура	уголкового типа, 3 слоя	уголкового и пластинчатого типа, 4-5 слоя	пластинчатого типа, 3 слоя

Выявленные диагностические морфолого-анатомические признаки включены в проект фармакопейной статьи на траву копеечника кавказского (*H. caucasicum* M.Bieb.).

Молекулярно-генетические и эколого-ценотические исследования

Нами секвенирован маркерный участок ITS1-5.8S ITS2 гена рРНК у представителей рода *Hedysarum* L. Филогенетическая реконструкция была основана на сравнении этого маркерного участка секвенированных нами образцов разного географического происхождения и данных из Генбанка NCBI. При анализе полученных данных следует отметить предполагаемую корреляцию между ареалом произрастания высокогорных видов, обитающих преимущественно на скалах, галечниках, осыпях, в субальпийском и альпийском поясе с увлажненным типом почвы и пурпуровой или розово-фиолетовой окраской лепестков венчика. Примерами могут служить такие виды, как *H. flexuosum* L., *H. arcticum* V.Fedtsch., *H. inundatum* Turez., *H. austrosibiricum* V.Fedtsch., *H. hedysaroides* L., *H. neglectum* Ldb., *H. caucasicum* M.Bieb., *H. alpinum* L., *H. theinum* Krasnob., *H. songaricum* Bong. При этом можно выделить группу желто-цветковых копеечников, произрастающих преимущественно на солонцеватых, сухих известняковых склонах с низким уровнем увлажненности почвы, на галечниках, на глинистых сланцах. Данные виды можно отнести к группе кальцефилов, среди них *H. Semenovii* Rgl. et Herd., *H. vicioides* Turez., *H. ussuriense* I.Schischk. & Kom., *H. formosum* Fisch. et Mey., *H. varium* Willd., *H. grandiflorum* Pall. Полученное филогенетическое древо показано на рисунке 2. Часть исследованных нами видов формирует хорошо поддерживаемые клады, что можно сказать о видах, отнесенных к секции *Obscura*.

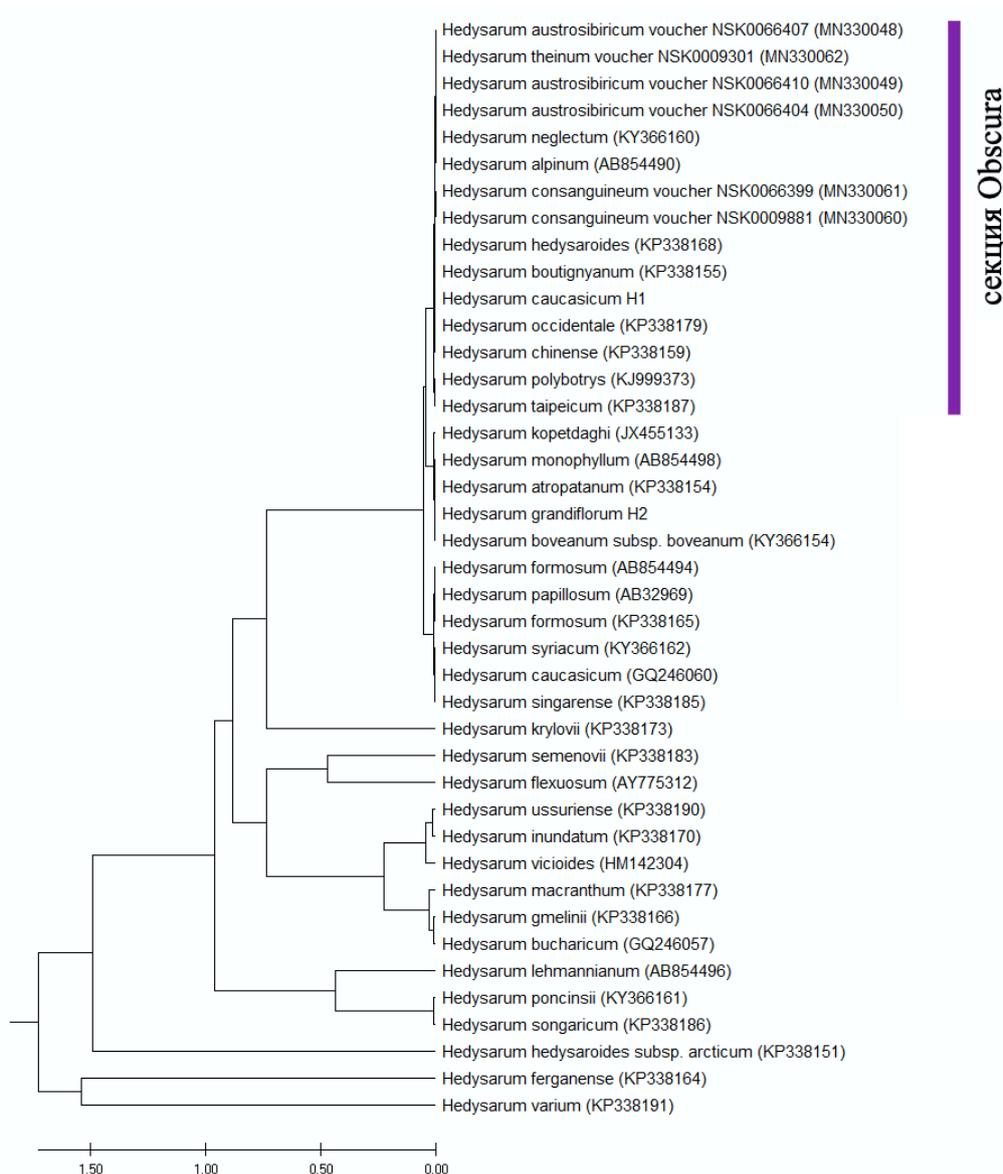


Рисунок 2 - Филогенетические взаимоотношения видов рода *Hedysarum* L.

Вследствие проведенных исследований можно предположить несколько направлений филогенетических закономерностей, в том числе касающихся корреляции между химическим составом основных групп биологически активных веществ, участвующих в метаболизме данного рода, в том числе маркерного ксантонового гликозида мангиферина, и изменением окраски лепестков венчика. Отдельным направлением можно считать возможную корреляцию эколого-фитоценотической характеристики произрастания видов и накопления основных групп ксантонов. На основании приведенного анализа можно составить прогноз дополнительных сырьевых источников мангиферина и других групп ксантонов при использовании молекулярных данных, примером данного предположения может служить секция *Obscura*. Для секции *Obscura*, к которой относятся более 20 видов, в том числе изученный нами *H. caucasicum* M. Vieb., характерны схожие морфологические и эколого-фитоценотические показатели, по данным Генбанка практически все указанные виды относятся к данной секции, что полностью подтверждает соотнесение классического таксономического и молекулярно-генетического метода. Для данной секции характерно значительное накопление мангиферина, от 3,0 до 6,0%. Следует отметить, что данная группа видов

произрастает преимущественно в альпийском и субальпийском поясе, и имеет характерную фиолетово-пурпурную окраску лепестков венчика. Впервые идентифицированы и изучены нуклеотидные замены в последовательности гена 5.8S рРНК образцов рода *Hedysarum* L. флоры Северного Кавказа.

Следует отметить, что наблюдаемая корреляция накопления вторичных метаболитов ксантонового ряда и эколого-фитоценотической характеристики могут послужить в дальнейшем для выделения видов секции *Obscura* для поиска дополнительных сырьевых источников мангиферина и его производных, обладающих выраженной противовирусной активностью.

Качественное обнаружение и количественное определение ксантонов

Хроматографирование проводили в системах: *n*-бутанол-уксусная кислота-вода (4:1:5); хлороформ-метанол-вода (13:7:2); 15% уксусная кислота, на пластинах «Sorbfil ПТСХ-АФ-А» 10 x 10 см и 10 x 15 см.

Проявление пластинок проводили опрыскиванием реактивами: раствор железа (III) хлорида 2%, спиртовой раствор алюминия хлорида 1%, парами аммиака и УФ-облучением (люминесцентная лампа УФ-А). В результате исследования методом ТСХ извлечения сырья *H. caucasicum* M.Bieb., *H. grandiflorum* Pall., *H. daghestanicum* Rupr. ex Boiss. спиртом этиловым 70 % в сравнении со стандартными образцами свидетельствуют о том, что в данных образцах присутствует ксантоновый гликозид – мангиферин.

Количественное определение суммы ксантонов в пересчете на мангиферин методом УФ-спектрофотометрии

Методика анализа суммы ксантонов в пересчете на мангиферин. Аналитическую пробу сырья измельчали до размера частиц 2 мм. Около 1,0 г (точная навеска) измельченного сырья помещают в коническую колбу со шлифом вместимостью 100 мл, добавляли 40 мл спирта этилового 70% и нагревали на водяной бане с обратным холодильником в течение 30 мин. Охлаждали в течение 30 мин. и фильтровали через вату в колбу для отгонки объемом 250 мл. Экстракцию проводили 2 раза. Полученное извлечение упаривали на роторном испарителе под вакуумом при температуре 80-85°C до водного остатка объемом около 50 мл, который, не охлаждая, количественно с помощью 50 мл воды очищенной переносили в делительную воронку вместимостью 250 мл и охлаждали до комнатной температуры. Содержимое делительной воронки обрабатывали хлороформом 3 раза порциями по 30 мл. Хлороформные извлечения отбрасывали.

Водную фазу обрабатывали этилацетатом 4 раза порциями по 20 мл. Этилацетатные извлечения через фильтр «красная лента» последовательно фильтровали с 2 г натрия сульфата безводного в колбу для отгонки объемом 250 мл, фильтр промывали 10 мл этилацетата. Упаривали извлечение до полного удаления органического растворителя на роторном испарителе под вакуумом при температуре 80-85°C. К остатку прибавляли 30 мл спирта этилового 70% и количественно переносили в мерную колбу вместимостью 50 мл с помощью того же спирта и доводили объем до метки (раствор А).

3,0 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 25 мл, прибавляли 0,5 мл уксусной кислоты разведенной 30%, объем раствора доводили до метки спиртом этиловым 70% и перемешивали (раствор Б). Измеряли оптическую плотность раствора Б на

спектрофотометре при длине волны 365 ± 2 нм в кювете с толщиной слоя 10 мм. В качестве раствора сравнения использовали спирт этиловый 70%.

Содержание в сырье суммы ксантонов в пересчете на мангиферин в сырье (X, %) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{A_x \times 50 \times 25 \times 100}{A_{1\text{см}}^{1\%} \times a_x \times 3 \times (100 - w)}$$

где A_x -значение оптической плотности в испытуемом растворе;

$A_{1\text{см}}^{1\%}$ -удельный показатель мангиферина, 325,1;

a_x -навеска сырья, г;

w -влажность сырья, %.

В результате комплексных хроматографических исследований трех видов рода *Hedysarum* L. выявлено, что максимальное содержание суммы ксантонов в пересчете на мангиферин составляет $0,62 \pm 0,021\%$ и наблюдается в траве копеечника кавказского (табл. 3). Полученные результаты свидетельствуют о перспективности дальнейшего исследования наземной части копеечника кавказского, что позволяет рассматривать данный вид в качестве дополнительного сырьевого источника мангиферина.

Таблица 3 - Содержание суммы ксантонов в пересчете на мангиферин в траве видов рода *Hedysarum* L. по величине удельного показателя поглощения мангиферина

Вид	Содержание суммы ксантонов в пересчете на мангиферин, %
<i>H. caucasicum</i> M.Bieb.	$0,62 \pm 0,02$
<i>H. grandiflorum</i> Pall.	$0,60 \pm 0,02$
<i>H. daghestanicum</i> Rupr. ex Boiss.	$0,56 \pm 0,01$

Валидационная оценка методики количественного определения суммы ксантонов в пересчете на мангиферин в наземной части копеечника кавказского проводилась с использованием стандартного образца (I) и удельного показателя поглощения (II) мангиферина и проводили по следующим показателям: специфичность, линейность, правильность и прецизионность. Полученные валидационные характеристики представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Валидационные характеристики методики количественного определения суммы ксантонов в пересчете на мангиферин в сырье *H. caucasicum* M.Bieb.

Валидационная характеристика	Сумма ксантонов в пересчете на мангиферин	
	I	II
Специфичность	Специфична	Специфична
Линейность	Уравнение регрессии	$y = 0,035x + 0,001$
	Коэффициент корреляции	$r = 0,9983$
Точность	RSD = 3,05 %	RSD = 2,30 %
Воспроизводимость	RSD = 3,39 %	RSD = 3,42 %

Из данных результатов следует, что предложенная методика количественного определения суммы ксантонов на мангиферин в траве копеечника кавказского отвечает параметрам валидации и, может быть, применена для оценки доброкачественности ЛРС «Копеечника кавказского трава», как дополнительного источника мангиферина.

Данная методика количественного определения суммы ксантонов в пересчете на мангиферин в траве *H. caucasicum* M.Bieb. методом УФ-спектрофотометрии разработана с использованием величины оптической плотности стандартного образца мангиферина (I) и величины удельного показателя поглощения мангиферина (II), установленной нами экспериментально.

Проведена валидация методики количественного определения суммы ксантонов в пересчете на мангиферин в траве *H. caucasicum* M.Bieb.; на основании полученных данных установлено, что предложенная методика является высокочувствительной, воспроизводимой и пригодна для использования в аналитической лаборатории.

Количественное определение мангиферина в траве видов рода *Hedysarum* L. методом капиллярного электрофореза

Анализ на капиллярном электрофорезе проводили при напряжении +20 кВ, температуре в капилляре +20° С, детектирование проводили спектрофотометрически при длине волны 383 нм, время анализа составило 10 минут. В качестве электролита использовали боратный буферный раствор 0,01 М с рН 9,2±0,02. Методы приготовления буферных растворов». Предварительно капилляр промывали последовательно растворами кислоты хлористоводородной 1 М и натрия гидроксидами 1 М. Промывку между растворами кислоты и щелочи, а также заключительную промывку перед анализом проводили водой очищенной. Промывочные растворы и растворы электролита фильтровали через бумажный фильтр Владипор типа МФАС-Б-4 с диаметром мембраны 25 мм. Буферные растворы, как и испытуемые, центрифугировали при 8000 об/мин в течение 5 минут. Анализ каждого раствора стандартного образца мангиферина повторяли дважды.

Оптическую плотность приготовленного раствора на спектрофотометре СФ-2000 измеряли в диапазоне длин волн 200-500 нм. С этой целью аликвоту объемом 1 мл помещали в две мерные колбы вместимостью 25 мл. В одной из мерных колб растворы доводили до метки спиртом этиловым 70 %, а в другой – боратным буферным раствором 0,01 М. В качестве растворов сравнения использовали в первом случае – спирт этиловый 70%, а во втором случае – боратный буферный раствор 0,01 М.

Получение очищенных спиртовых извлечений из сырья проводили в соответствии с методикой, разработанной нами для определения суммы ксантонов в пересчете на мангиферин методом УФ-спектрофотометрии для исследуемых образцах (методика описана выше, в разделе УФ-спектрофотометрии). Центрифугирование раствора А проводили в течение 5 минут при 8000 об/мин.

Содержание мангиферина в сырье (X, %) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{C \times 50 \times 100 \times 100}{1000 \times a_x \times V_x \times (100 - w)}$$

где C – концентрация, мг/мл;

a_x - навеска сырья, г;

V_x - аликвота, мл;

w - влажность сырья, %.

В таблице 5 представлены результаты количественного определения мангиферина в исследуемых видах.

Таблица 5 - Содержание мангиферина в траве видов рода *Hedysarum* L.

Вид	<i>n</i>	<i>f</i>	\bar{X}	S_x	$S_{\bar{x}}$	<i>t</i> (<i>P</i> , <i>f</i>)	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}$, %
<i>H. caucasicum</i> M.Bieb.	6	5	0,245	0,0061	0,0025	2,57	0,006	2,59
<i>H. grandiflorum</i> Pall.	6	5	0,144	0,0056	0,0023	2,57	0,006	4,13
<i>H. daghestanicum</i> Rupr. ex Boiss.	6	5	0,045	0,0013	0,0005	2,57	0,001	2,93

На основании полученных экспериментальных данных можно сделать вывод, что наибольшим содержанием мангиферина среди изученных видов рода копеечник обладает *H. caucasicum* M.Bieb., что подтверждает предположение, основанное на молекулярно-генетических исследованиях, так как именно этот вид относится к секции *Obscura*, как и копеечник альпийский, используемый для получения мангиферина.

Количественное определение мангиферина в траве *H. caucasicum* M.Bieb. методом ВЭЖХ

Буферный раствор. В мерную колбу вместимостью 1000 мл помещали 15,6 г натрия фосфата однозамещенного дигидрата, который растворяли с помощью 200 мл воды очищенной и доводили объем до метки, перемешивали. Потенциометрическим методом определяли значение рН, которое должно быть $4,40 \pm 0,05$.

Подвижная фаза. Смесь буферного раствора, ацетонитрила и метанола в соотношении 81:16:3.

При разработке методики количественного определения мангиферина методом ВЭЖХ за основу нами была принята методика количественного определения суммы ксантонов в пересчете на мангиферин методом УФ-спектрофотометрии, описанная ранее и заключается в следующем.

2,0 мл раствора А помещали в мерную колбу вместимостью 10 мл, растворяли в подвижной фазе и доводили объем раствора до метки подвижной фазой, затем перемешивали. Раствор фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,45 мкм.

По 20 мкл стандартного раствора мангиферина и испытуемого раствора вводят в хроматограф с помощью инжектора с дозирующей петлей и последовательно хроматографируют, получая не менее трех хроматограмм каждого из растворов.

Содержание в сырье мангиферина (X, %) рассчитывали по формуле:

$$X = \frac{S_x \cdot a_0 \cdot 50 \cdot 10 \cdot 1 \cdot P \cdot 100 \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot 2 \cdot 25 \cdot 10 \cdot 100 \cdot (100 - w)} = \frac{S_x \cdot a_0 \cdot P \cdot 100}{S_0 \cdot a \cdot (100 - w)},$$

где S-среднее арифметическое значение площади пика мангиферина на хроматограммах испытуемого раствора образца;

S_0 -среднее арифметическое значение площади пика мангиферина на хроматограммах стандартного раствора;

a_0 -навеска стандартного образца мангиферина, в граммах;

a -навеска препарата в граммах;

P-содержание основного вещества, в процентах;

w-потер в массе при высушивании, в процентах.

Разработанная методика отличается хорошей воспроизводимостью в сочетании с простотой исполнения, относительное стандартное отклонение (ε) в анализе всех объектов не превышает 4,0%, что позволяет применять ее в анализе различных видов сырья копеечника. В таблице 6 представлены результаты количественного определения мангиферина в исследуемых объектах.

Таблица 6 - Результаты количественного определения мангиферина (%), (n=6)

№	f	\bar{x}	s^2	$s_{\bar{x}}$	$P, \%$	$t(P, f)$	$\Delta\bar{x}$	$\bar{\varepsilon}, \%$
1.	5	0,148	0,000016	0,001621	90	2,015	0,003	2,21
2.	5	0,134	0,000034	0,005888	90	2,015	0,005	3,62

Общий фитохимический скрининг основных групп БАВ

В результате в видах рода *Hedysarum* L., а именно *H. caucasicum* M.Bieb., *H. grandiflorum* Pall., *H. daghestanicum* Rupr. ex Boiss. были обнаружены такие биологически активные вещества как: полисахариды, тритерпеновые соединения, флавоноиды, сапонины, полифенольные соединения, лейкоантоцианы и дубильные вещества. Количественное содержание дубильных веществ в *H. caucasicum* M.Bieb. составило $5,43 \pm 0,15\%$.

Аминокислотный состав

Сравнительный аминокислотный состав трех изученных образцов видов рода копеечник, произрастающих на территории Северного Кавказа, показал, что в значительных количествах в надземных органах изученных видов обнаружены такие аминокислоты, как аспарагиновая (1,84-2,68%) и глутаминовая кислоты (1,29-1,33%), а также пролин (0,83-1,39%), лейцин (0,86-0,90%) и фенилаланин (0,58-0,63%).

Изучение аминокислотного состава при проведении комплексного фармакогностического анализа является одним из обязательных направлений исследований, так как аминокислоты участвуют в биогенезе многих биологически активных соединений, в том числе ксантонов. Известно, что основными компонентами биосинтеза ксантонов являются ацетил-КоА, мевалоновая и шикимовая кислоты, из которых синтезируется в дальнейшем фенилаланин. Полученные результаты исследования могут быть в дальнейшем использованы при составлении комплексной метаболомной оценки ЛРС видов рода *Hedysarum* L.

Показатели подлинности травы

Внешние признаки

Цельное сырьё. Цельные или измельчённые фрагменты побегов, черешков, листовых пластинок, а также элементов соцветия. Листья непарно-перистосложные, из 8–12 пар листочков, листочки эллиптические или яйцевидно-продолговатые с остроконечием на верхушке. Соцветия кистевидные на длинных ножках, в 1,5–2 раза длиннее листьев, не очень густые. Нижний зубец чашечки равен трубочке, остальные короче. Край листа цельный, жилкование перисто-сетчатое. Листья с верхней и нижней стороны голые. Цвет листьев с обеих сторон светло-зелёный, зелёный или желтовато-зелёный, венчик фиолетовый, запах слабоароматный, вкус водного извлечения горьковатый.

Измельчённое сырьё. Кусочки стеблей, листьев различной формы, соцветий, проходящие сквозь сито с отверстиями размером 5 мм. Цвет светло-зелёный, запах слабоароматный, вкус водного извлечения горьковатый.

Порошок. порошок желто-зеленого цвета, проходящих сквозь сито с отверстиями диаметром 2 мм, запах слегка ароматный, вкус водного извлечения горьковатый (рис. 3).



Рисунок 3 - Копеечника кавказского трава:

*А-цельное сырье; Б-измельчённое сырье (проходящее сквозь сито диаметром 5 мм);
В-порошок сырья (проходящее сквозь сито диаметром 2 мм)*

Определение основных групп биологически активных веществ

Тонкослойная хроматография

Приготовление стандартного образца мангиферина. Около 0,01 г (точная навеска) стандартного образца мангиферина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 20 мл спирта этилового 70%, затем объем доводят тем же спиртом до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 10 мл, доводят до метки спиртом этиловым 70% и перемешивают.

На хроматограмме должна наблюдаться зона адсорбции бледно-желтого цвета при просматривании в дневном свете, меняющая окраску на бледно-зеленую окраску в УФ-свете, соответствующая зоне адсорбции СО мангиферина. Наличие других зон адсорбции допускается.

Испытания

Количественное определение. Цельное сырье, измельченное сырье, порошок: суммы ксантонов в пересчете на мангиферин-не менее 0,5%.

Приготовление растворов

Приготовление СО мангиферина. Около 0,01 г (точная навеска) СО мангиферина помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, растворяют в 15 мл спирта этилового 70%, затем объем доводят тем же спиртом до метки и перемешивают. 1,0 мл полученного раствора помещают в мерную колбу вместимостью 25 мл, доводят до метки спиртом этиловым 70% и перемешивают.

Методика анализа суммы ксантонов в пересчете на мангиферин представлена в разделе количественное определение методом УФ-спектрофотометрии.

Упаковка, маркировка и транспортирование. В соответствии с требованиями ОФС «Упаковка, маркировка и транспортирование лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Хранение. В соответствии с требованиями ОФС «Хранение лекарственного растительного сырья и лекарственных растительных препаратов».

Интродукционные исследования

Проведены комплексные интродукционные исследования видов рода *Hedysarum* L., включающие определение наиболее эффективных способов размножения видов рода

Hedysarum L., изучение биологических особенностей изучаемых видов как в природных популяциях, так и в условиях интродукции на территории Горного ботанического сада ФГБУН ДФИЦ РАН (участок Цудахар, участок Гуниб), а также на базе Ботанического сада ПМФИ. Кроме того, проведено изучение ритма сезонного развития видов рода *Hedysarum* L., составлены феноспектры данных видов. При анализе онтогенетического развития видов рода *Hedysarum* L. учитывались такие показатели, как морфологические признаки и морфометрические показатели возрастных состояний видов, а также определение урожайности сырья. Для копеечника кавказского, собранного в 2017–2018 гг. на территории КБР (селения Безенги), РСО-Алании (селения Дзинага), а также в КЧР (Домбай, ущелье Алибек), характерны следующие отличительные морфометрические показатели, такие как ветвистость как вегетативных, так и генеративных побегов, показатель олиственности побегов, количество листьев и размеры соцветий. Выявленные показатели характеризуют эколого-ценотические особенности различных мест обитания данных образцов.

Проведен сравнительный морфометрический анализ образцов копеечника дагестанского (*H. daghestanicum* Rupr. ex Boiss.), собранных в течение 2015, 2016, 2017 гг. на территории различных районов республики Дагестан Казбековский район, с. Чиркей, Ботлихский район (окрестности с. Годобери, с. Анди). Выявлены следующие закономерности: в пределах популяции с. Годобери наблюдается увеличение таких показателей, как количество листьев, длина листа, ширина листа, длина черешка, ширина и длина непарного листочка, а также увеличение размеров и густоты соцветий.

Для проведения интродукционных исследований использовался способ размножения семенами. Семена в количестве 100 высаживали на участках площадью 5 на 5 м² на различных типах рельефа, в почву на расстоянии 15-20 см, предварительно подвергали скарификации, почву рыхлили и увлажняли. Проведенный анализ произрастания данных видов в естественных условиях показал, что копеечник кавказский предпочитает открытые увлажненные участки альпийских и субальпийских лугов, при анализе местообитания (юго-восточный склон г. Алибек, в лесной зоне и на открытых увлажненных участках альпийского пояса, субальпийские луга и увлажненные тенистые участки вдоль правого берега р. Черек Безенгийский), установлены режим умеренной инсоляции и максимальный режим увлажнения, что характерно участку Гуниб Горного ботанического сада ФГБУН ДФИЦ РАН.

Что касается копеечника дагестанского и копеечника крупноцветкового, то при анализе эколого-ценотических мест обитания данных видов выявлена приспособленность к открытым аридным участкам каменистых мелко щебнистых склонов с низким уровнем увлажненности и высоким уровнем инсоляции. Данные показатели были учтены при посадке образцов данных видов на территории участка Цудахар Горного ботанического сада ФГБУН ДФИЦ РАН. Полученные результаты изучения ритма сезонного развития видов рода копеечника представлены в таблице 23, для каждого вида составлены феноспектры наблюдений за 2017-2020 гг. (рис. 4). Вегетация указанных видов возобновляется в различные сроки при изменяющихся температурных условиях, а заканчивается, в период второй половины июня – начале июля.

Результаты изучения сезонного развития видов рода *Hedysarum* L. на территории Горного ботанического сада ФГБУН ДФИЦ РАН показали, что в связи с растянутым периодом окончания вегетации рассматриваемый феноритмотип копеечника кавказского неоднороден. Основная масса интродуцированных образцов вегетируют более продолжительно. По срокам цветения *H. caucasicum* M.Vieb. относится к летней группе, а *H. daghestanicum* Rupr. ex. Boiss.

и *H. grandiflorum* Pall. к летним группам растений. Продолжительность фазы вегетации варьирует в диапазоне 85-134 дней, составляя в среднем 122 ± 2 дней.

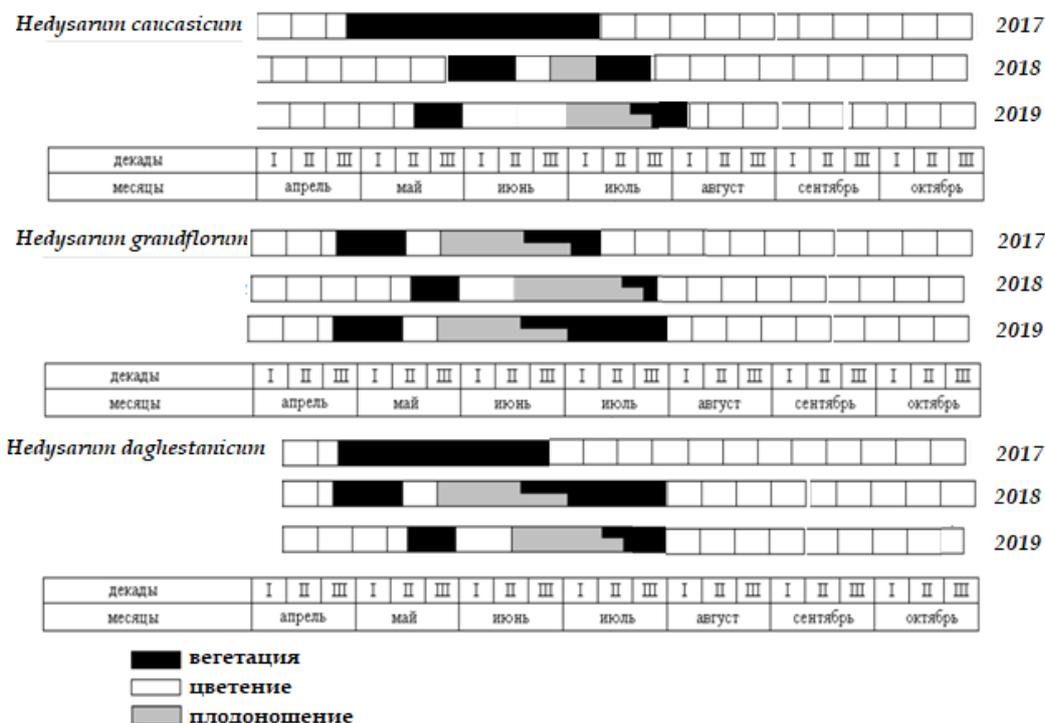


Рисунок 4 - Феноспектры трех видов рода *Hedysarum* L. в условиях интродукции Горного ботанического сада ФГБУН ДФИЦ РАН.

В результате проведенных фенологических исследований отмечено, что хронологически фаза вегетации и фаза цветения в природных популяциях и в условиях интродукции видов рода *Hedysarum* L. схожи, при этом длительность фазы плодоношения и отмирания незначительно различаются. Предположительно, это связано с регулярной системой полива растений в условиях интродукции.

Для определения урожайности сырья в условиях интродукции использовали метод расчета урожайности при использовании метода учетных площадок. Собранное с площадок сырье взвешивали и полученные данные приведены в таблице 7.

Таблица 7 - Показатели урожайности видов рода *Hedysarum* L. на территории Горного ботанического сада ФГБУН ДФИЦ РАН

Наименование вида	Всхожесть, %	Количественное содержание суммы ксантонов	Рассчитанное значение урожайности, кг/м ²	Метрологические характеристики
<i>H. caucasicum</i> M.Bieb.	53,3	$0,61 \pm 0,02$	$0,203 \pm 0,0043$	$C=0,066534; \delta=0,0172; m=0,0043; m=2\%$
<i>H. daghestanicum</i> Rupr. ex Boiss.	36,7	$0,59 \pm 0,02$	$0,174 \pm 0,0104$	$C=0,119413; \delta=0,0345; m=0,0104; m=6\%$
<i>H. grandiflorum</i> Pall.	46,7	$0,55 \pm 0,01$	$0,183 \pm 0,0039$	$C=0,03506; \delta=0,0144; m=0,0039; m=2\%$

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное сравнительное фармакогностическое исследование видов рода *Hedysarum* L., позволило сделать общие выводы:

1. Впервые проведено морфолого-анатомическое исследование каулифолиарной системы трех видов рода *Hedysarum* L.: *H. caucasicum* M.Bieb, *H. daghestanicum* Rupr. ex. Boiss., *H. grandiflorum* Pall., установлены диагностические признаки, к которым относятся трихомы в виде простых одноклеточных и двуклеточных волосков с бородавчатой кутикулой, устьичные аппараты аномоцитного и анизоцитного типа, седловидная форма черешка на поперечном сечении, наличие идиобластов в паренхимной обкладке коллатеральных проводящих пучков;

2. Впервые проведено молекулярно-генетическое исследование *H. caucasicum* M.Bieb, *H. daghestanicum* Rupr. ex. Boiss., *H. grandiflorum* Pall. Секвенирован маркерный участок ITS1-5.8S ITS2 гена рРНК, по Сэнгеру методом СТАВ. Выявлена корреляция накопления вторичных метаболитов ксантонового ряда и эколого-фитоценотической характеристики позволяет предположить перспективность видов секции *Obscura* для поиска дополнительных сырьевых источников мангиферина и его производных, обладающих выраженной противовирусной активностью;

3. Разработаны эффективные методики количественного определения суммы ксантонов в пересчете на мангиферин из указанных видов рода *Hedysarum* L., методами УФ-спектрофотометрии, капиллярного электрофореза и высокоэффективной жидкостной хроматографии. Методом дифференциальной УФ-спектрофотометрии проводили с использованием величины оптической плотности стандартного образца мангиферина и величины удельного показателя поглощения мангиферина, установленной нами экспериментально. Проведена валидация методики количественного определения суммы ксантонов в пересчете на мангиферин в траве *H. caucasicum* M.Bieb., на основании полученных данных установлено, что предложенная методика является высокочувствительной, воспроизводимой и пригодна для использования в аналитической лаборатории;

4. Проведен первичный фитохимический скрининг биологически активных соединений травы *H. caucasicum* M.Bieb, *H. daghestanicum* Rupr. ex. Boiss., *H. grandiflorum* Pall. Установлено наличие в трех видах следующих БАВ: полифенольных соединений, лейкоантоцианов, флавоноидов, дубильных веществ, полисахаридов, сапонинов. Количественное содержание дубильных веществ в надземных органах копеечника кавказского составило $5,43 \pm 0,15\%$.

Изученный аминокислотный состав в траве *H. caucasicum* M.Bieb, *H. daghestanicum* Rupr. ex. Boiss., *H. grandiflorum* Pall., показал, что в значительных количествах в траве обнаружены такие аминокислоты, как аспарагиновая (1,84-2,68%) и глутаминовая кислоты (1,29-1,33%), а также пролин (0,83-1,39%), лейцин (0,86-0,90%) и фенилаланин (0,58-0,63%). Данные исследования представляют интерес в связи с тем, что фенилаланин и пролин являются компонентами биосинтеза ксантонов, что может быть использовано в дальнейшем при составлении комплексной метаболомной характеристики растительного сырья видов рода *Hedysarum* L.

Проведен спектральный анализ минерального состава, который показал, что в траве копеечника кавказского присутствуют макроэлементы: калий, натрий, фосфор, магний, железо, кальций, кремний, а также микроэлементы, такие как цинк, марганец, медь, молибден.

Полученные результаты элементного состава необходимы при комплексном анализе суммы действующих веществ данного растения;

5. Разработаны: проект ФС «Копеечника кавказского трава» как дополнительного сырьевого источника мангиферина, апробированный на базе ЗАО «ВИФИТЕХ» (Московская область), проект «Инструкции по сбору и сушке копеечника кавказского травы» апробирован в Горном ботаническом саду ФГБУН ДФИЦ РАН (г. Махачкала) и ООО «Витаукт-Пром» (г. Майкоп).

Методики количественного определения суммы ксантонов в пересчете на мангиферин методом УФ-спектрофотометрии и количественного определения мангиферина методами капиллярного электрофореза и ВЭЖХ используются в работе ООО «Витаукт-Пром», ЗАО «ВИФИТЕХ». Методики идентификации суммы ксантонов в пересчете на мангиферин внедрены в учебный процесс для аспирантов на кафедре фармакогнозии, ботаники и производства фитопрепаратов Пятигорского медико-фармацевтического института – филиала ФГБОУ ВО «ВолГМУ» Минздрава России и студентов 3 и 4 курса фармацевтического факультета на кафедре фармации ФГБОУ ВО «Дагестанский государственный медицинский университет».

Практические рекомендации. Полученные результаты диссертационной работы способствуют в усовершенствовании подходов к стандартизации ЛРС, содержащих ксантоны и могут быть применены в учебном процессе по дисциплинам «Фармакогнозия» и «Фармацевтическая химия».

Перспективы дальнейшей разработки темы заключаются в последующем изучении химического состава ЛРС, содержащих ксантоны, разработки методик анализа и стандартизации ЛРС и лекарственных растительных препаратов.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. Имачуева, Д.Р. Современное состояние изученности растений рода копеечник (*Hedysarum* L.) флоры Кавказа/ Д.Р. Имачуева, Ф.К. Серебряная// **Фармация и фармакология.** - 2016. - Т4. - №6. - С. 4-32.
2. Имачуева, Д.Р. Сравнительное морфолого-анатомическое исследование каулифолиарной системы *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Voiss. (*Fabaceae*) / Д.Р. Имачуева, Ф.К. Серебряная // «Молодые ученые и фармация XXI века»: сборник трудов четвертой научно-практической конференции аспирантов и молодых ученых. Москва: ВИЛАР, 2016. - С. 51-56.
3. Имачуева, Д.Р. Перспективы изучения северокавказских видов рода копеечник (*Hedysarum* L.) семейства бобовые (*Fabaceae*) / Д.Р. Имачуева, Ф.К. Серебряная, И.Н. Зилфикаров // «Человек и лекарство»: Тезисы докладов XXIV Российского национального конгресса. Москва: Видокс, 2017. - С. 98.
4. Имачуева, Д.Р. Определение общих числовых показателей копеечника кавказского (*Hedysarum caucasicum* M. Vieb.) / Д.Р. Имачуева, Ф.К. Серебряная // Евразийский союз ученых. - 2017. - №43. - Ч.1. - С. 70-73.
5. Имачуева, Д.Р. Изменчивость морфометрических признаков *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Voiss. в различных популяциях на территории Республики Дагестан/ Д.Р. Имачуева, Ф.К. Серебряная, Ш.М. Зубаирова // Ботанический вестник Северного Кавказа.- 2017. - №4. - С. 17-24.

6. Имачуева, Д.Р. Результаты предварительного фитохимического скрининга и определение общих числовых показателей качества копеечника кавказского (*Hedysarum caucasicum* M.Vieb.) семейства *Fabaceae* / Д.Р. Имачуева, Ф.К. Серебряная // Беликовские чтения: материалы VI Всероссийской научно-практической конференции. Пятигорск: РИА на Кавминводах, 2018. - С. 166-171.
7. Имачуева, Д.Р. Морфометрические признаки *Hedysarum daghestanicum* Rupr. ex Boiss. и *Hedysarum caucasicum* M. Vieb, произрастающие на Северном Кавказе / Д.Р. Имачуева, Ф.К. Серебряная // Разработка, исследование и маркетинг новой фармацевтической продукции. Пятигорск: РИА-КМВ, 2018. - Вып.73. - С. 87-97.
8. Имачуева, Д.Р. Изучение аминокислотного состава надземной части копеечника кавказского / Д.Р. Имачуева, Ф.К. Серебряная // «IV Гаммермановские чтения»: сборник научных трудов. Москва: РУСАЙНС, 2018. - С. 127-129.
9. Имачуева, Д.Р. Поиск дополнительных сырьевых источников мангиферина/ Д.Р. Имачуева, Ф.К. Серебряная // Неделя науки 2019: материалы Международного молодёжного форума. Ставрополь: Изд-во СтГМУ, 2019. - С. 644-646.
10. Имачуева, Д.Р. Фармакогностическое исследование видов рода копеечник, произрастающих на территории Северного Кавказа / Д.Р. Имачуева, Ф.К. Серебряная // Молодые ученые в решении актуальных проблем науки: материалы IX Международной научно-практической конференции. Владикавказ: изд-во «Веста», 2019. - С.98-100.
11. Серебряная, Ф.К. Pharmacognostical investigations of *Hedysarum caucasicum* Vieb. (*Fabaceae*) - an ethnomedicinal plant of Northern Caucasus, Russia, determination of mangiferin and antibacterial potentials / Д.Р. Имачуева, Ф.К. Серебряная, З.А. Гусейнова // **Pharmacognosy Journal**. - 2020. - Vol. 12. - № 3. - P. 510-518.
12. Имачуева, Д.Р. Результаты сравнительного аминокислотного анализа видов рода копеечник, произрастающих на территории Северного Кавказа / Д.Р. Имачуева, Ф.К. Серебряная // **Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье»**. - 2020 - №1. - С. 82-88.
13. Имачуева, Д.Р. Phytochemical investigations from *Hedysarum* species of Caucasus, Russia / Д.Р. Имачуева, Ф.К. Серебряная // Plant Derived Natural Products as Pharmacological and Nutraceutical Tools PSE e-Congress 2020. - 2020. - P. 75-76.
14. Имачуева, Д.Р. Количественное определение суммы ксантонов в пересчете на мангиферин в надземных органах видов рода копеечник (*Hedysarum* L.) методом УФ-спектрофотометрии / Д.Р. Имачуева, Ф.К. Серебряная, И.Н. Зилфикаров // **Химия растительного сырья**. - 2020 - № 3. - С. 179-186.
15. Имачуева, Д.Р. *Hedysarum* Species from Caucasus / Д.Р. Имачуева, Ф.К. Серебряная // *Legume Crops - Prospects, Production and Uses*. London: IntechOpen, 2020. - 23 p.